

Aus dem Pathologischen Institut der Freien Universität Berlin
im Städtischen Krankenhaus Westend

Direktor: Professor Dr.med. Wilhelm M a s h o f f

Thrombenlipide

Vergleichende histologische und biochemische Untersuchungen

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Karin Bathe

aus

Berlin

1964

Aus dem Pathologischen Institut der Freien Universität Berlin
im Städtischen Krankenhaus Westend

Direktor: Professor Dr.med. Wilhelm M a B h o f f

Thrombenlipide

Vergleichende histologische und biochemische Untersuchungen

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Karin Bathe

aus

Berlin

Dekan: Professor Dr.med. Hugo G a s t e i g e r

Referent: Professor Dr.med. Wilhelm M a ß h o f f

Korreferent: Professor Dr. med. Friedrich S t e i n



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 8. Oktober 1964

	Seite
<u>Einleitung</u>	3
<u>Teil I: Morphologische Untersuchung</u>	6
Ausführung	
Ergebnis und Diskussion:	
1) Morphologie des Thrombus an Hand von H-E-Schnitten	12
2) Ergebnis der Fettfärbemethoden	15
3) Lipidgehalt der Thromben an Hand der mit Sudan Schwarz B und Scharlachrot gefärbten Präparate	16
a) Intrazelluläre Lokalisation	17
b) Extrazelluläre Lokalisation	20
c) Lipidsynthese	25
d) Fettphanerose	26
<u>Teil II: Chemische Untersuchung</u>	28
A. Quantitativer Teil:	28
1) Methodik	28
2) Ergebnisse und Bewertung	31
B. Qualitativer Teil:	37
1) Papierchromatographie	37
a) Materialien	38
b) Ausführung	39
c) Vergleichschromatogramme	41
c ₁) Qualitative Untersuchung von gesundem Blut	41
c ₂) Qualitative Untersuchung des Ather-Aethanolextraktes	42
c ₃) Papierchromatogramm mit Zusatzversuch	43
c ₄) Ergebnisse und Bewertung der Haupt- und Vergleichschromatogramme	44
2) Säulenchromatographie	
Durchführung und Ergebnis	50
3) Phosphatidbestimmung	
Durchführung und Ergebnis	54
4) Cholesterinbestimmung	
Durchführung und Ergebnis	61
C. Diskussion	64
<u>Teil III: Ätiologische Grundlagen</u>	68
Thromben (5,8,6,9,10,11,13,14,15,18,12)	
- Krankengeschichten - Sektionsbefunde - Diskussion	
<u>Zusammenfassung</u>	88
<u>Literaturverzeichnis</u>	90

Einleitung

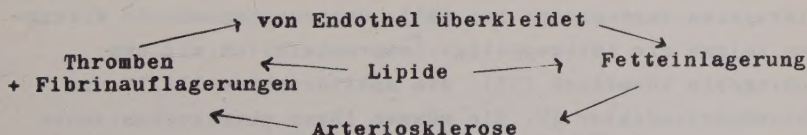
=====

Die Pathologie der Blutlipide ist seit rund 50 Jahren Gegenstand intensiver Untersuchungen mit recht widerspruchsvollen Ergebnissen. Als erster machte Anitschkow (2) auf die schwankenden Cholesterinwerte im Plasma aufmerksam und wies ihnen eine entscheidende Rolle in der Genese der Arteriosklerose zu.

Unabhängig davon wurden bald Zusammenhänge zwischen dem Blutgerinnungsmechanismus und den Blutlipiden erkannt. So konnten Schrade und Bürger (93) bereits 1934 im Gesamtblut eine Veränderung des Gerinnungsmechanismus im Sinne einer Hyperkoagulabilität als Folge von alimentären Fettbelastungen feststellen. Die folgenden Untersuchungen verliefen damit unter doppeltem Aspekt: Pathologisch (bezüglich ihrer Quantität und Relation) veränderte Blutlipide sind nicht nur maßgeblich an arteriosklerotischen Vorgängen beteiligt, sondern beeinflussen auch die Gerinnungsfaktoren im Sinne einer verstärkten Gerinnungsbereitschaft.

Gewisse Verbindungen beider Phänomene ergeben sich aus der Anschauung Duguids (28,29), wandständige Thromben könnten nicht nur Folgeerscheinung einer sklerosierten Gefäßwand, sondern auch deren Ursache sein. Dabei konnte er sich auf Rokitansky (86) berufen, der bereits vor 100 Jahren in den arteriosklerotischen Plaques thrombotisches Material wiederzuerkennen glaubte. Duguids umstrittene Theorie wurde in neuerer Zeit durch die Untersuchungen von Crawford, Levene (27), Meessen (66) und Müller gestützt.

In diesem Zusammenhang erörtert Perlick (73) das Bestehen eines circulus vitiosus, wobei die Lipide sowohl die Arteriosklerose als auch die Fibrinausfällungen beeinflussen dürften:



Ob die Blutlipide als primär auslösende Faktoren in Frage kommen oder nur mitbestimmende Funktionen haben, läßt sich heute noch nicht mit genügender Sicherheit sagen. Dies betrifft insbesondere die Vorgänge bei der Gerinnung. Die widersprechenden Ansichten schlagen sich in der Fülle der Veröffentlichungen nieder, die von Spezifitätserhebungen an Fettsäuren über die Klärsysteme des Plasmas bis zu dem weiten Feld der fetthaltigen bzw. von Fett beeinflusbaren Gerinnungsaktivatoren und -inhibitoren reichen.

Im Rahmen dieser Arbeit soll besonders auf die Befunde eingegangen werden, die sich mit den Phosphatiden beschäftigen. Diese gelten inzwischen als aktivste lipoidige Kräfte im Gerinnungsmechanismus. Wir unterscheiden - neben den inaktiven Substanzen - Aktivatoren und Inhibitoren, die sowohl in der Gerinnungsphase als auch in die fibrinolytischen Vorgänge eingreifen. Als allgemein gesichert kann man die fördernde Wirkung des Colamin-Kephalin (=Phosphatidyl-Äthanolamin) ansehen. Es ist Bestandteil der Thrombocyten (Thrombocytenfaktor III) und der Chylomikronen (85). Seine Zerstörung hat auch die Inaktivierung des Faktors IX zur Folge (73,55). Chylomikronen wandern mit den β -Lipoproteinfraktionen. Seren mit vermehrten großmolekularen β -Lipoproteinfraktionen lassen gleichzeitig eine erhöhte Gerinnungstendenz erkennen.

Das Phosphatidylserin wird uneinheitlich bewertet. Nach Poole und Mitarbeitern (77) wirkt es in kleinen Dosen gerinnungsfördernd, in großen Dosen gerinnungshemmend. Barkhan (6) und Mustard (70) halten es für gerinnungshemmend. Die Rolle des Lecithin und des Sphingomyelin im Gerinnungsablauf ist ebenfalls noch nicht abgeklärt. Wahrscheinlich aktiviert das Lecithin die Fibrinolyse (43) und ein Lipämieklärsystem, das vom Heparin-aktivierten Lipämieklärsystem verschieden ist (95). Gerinnungshemmende Wirkungen zeigen die Antikephaline (wahrscheinlich mit dem Sphingosin identisch (73), die Antithrombine III/IV und Thrombocytenfaktor IV. Sie müssen ihren physikochemischen Eigenschaften zufolge den Lipoproteiden zugerechnet wer-

den (55). Andererseits soll auch die Fibrinolyse gehemmt werden, wie Greig und Runde nach Gaben von phosphatidhaltigen Speisefetten (Butter, Eier, Sahne) nachzuweisen versuchten (39, 40).

Die vielschichtigen Angriffspunkte der Phosphatide sind bis zum heutigen Tage keineswegs geklärt, ihr Wirkungsmechanismus im Verlauf einer alimentären Lipämie bzw. einer essentiellen oder symptomatischen Hyperlipämie nicht gesichert.

Die in vivo und in vitro durchgeführten Untersuchungen beschränken sich meist auf die bloße Feststellung einer Hyperkoagulabilität im Gefolge einer alimentären Lipämie. Das eigentliche Endprodukt jedoch, das ausgefallene Koagulum, das sich in vivo als Thrombus manifestiert, wurde unseres Wissens noch nicht auf seinen Lipidgehalt untersucht.

Die Aufgabe dieser Arbeit besteht darin, den Lipidgehalt des der Leiche entnommenen Thrombus zu ermitteln und seine Lipide zu analysieren. Retrospektiv soll auf Grund der erhobenen Befunde die Möglichkeit eines Zusammenhanges mit pathologisch verändertem Serumlipidspiegel diskutiert werden.

Die Untersuchung gliedert sich in drei Teile. Die Lipide der Thromben werden zunächst mit morphologischen Methoden untersucht, sodann chemisch quantitativ und qualitativ ausgewertet und zuletzt in Verbindung mit möglichen ätiologischen Faktoren gebracht.

Teil I.

Die Thromboseforschung aus der Sicht des Morphologen ist bereits vor vielen Jahren durch drei gleichwertige kausale Faktoren geprägt worden. Diese genetische Trias, wie sie bereits Virchow (104) 1862 postulierte, umfaßt als muralen Faktor die Gefäßwandläsion, als humoralen Faktor die Veränderungen der Gerinnungsfähigkeit des Blutes und als hämodynamischen Faktor die Strömungsveränderungen innerhalb der Gefäße. Die Bedeutung dieser Faktoren wurde in der Folgezeit von den einzelnen Autoren unterschiedlich gewertet, an ihrer Existenz konnte jedoch niemals gezweifelt werden.

Der Schwerpunkt der Thromboseforschung hat sich in den letzten 10 bis 20 Jahren von der Morphologie in immer stärkerem Maße auf die Gerinnungsphysiologie verlagert. Die Ergebnisse rechtfertigen die neue Anschauung, in den Veränderungen des Gerinnungspotentials des *primum movens* der Thromboseentstehung zu sehen.

Aschoff (5) arbeitete den grundsätzlichen Unterschied zwischen dem Agglutinations- und Koagulationsthrombus heraus. Während der erste durch physikalisch-chemische Änderungen der miteinander verklebenden und dann ausfallenden Blutplättchen entsteht, ist der letzte mehr ein Produkt des intravasalen Gerinnungsmechanismus, begünstigt durch Strömungsverlangsamungen, Rückströmungen oder Wirbelbildungen. Den Beweis fand Aschoff einerseits in dem fast völligen Fehlen von Fibrin in Agglutinationsthromben, andererseits in dem wohl ausgebildeten Fibrinestrich der Gerinnungsthromben. Zusätzlich führte er den sogenannten Plättchenfaktor ein, der Zahl und Agglutinationsfähigkeit der Thrombocyten berücksichtigt und bei pathologischen Veränderungen der Bildung eines Agglutinationsthrombus Vorschub leisten kann (19).

Diese Vorstellungen müssen insofern revidiert werden, als der Ausfall von Plättchen eben doch einen Akt des Gerinnungsmechanismus darstellt (52). Er wird ausgelöst durch

die Endothelläsion der arteriellen Wand, wobei die Gerinnungsfaktoren IX und VII, sowie der Hagemann-Faktor (52, 75, 111) in eine aktive Form überführt werden und die visköse Metamorphose der Thrombocyten einleiten, die später nach Bildung des Thrombins in großem Umfange fortgesetzt wird. Wahrscheinlich ist auch die austretende Gewebsthrombokinasase, die reichhaltig im Gefäßendothel und in der Intima gefunden wird, an den gerinnungsauslösenden Vorgängen beteiligt. (Loeligen, zit. bei Koller 52).

Der Thrombenentstehung in venösen Gefäßen gehen die gleichen Ursachen voraus, hier sind es jedoch lokale und allgemeine Strömungsveränderungen mit ihren Auswirkungen auf die Verteilung der corpuskulären Elemente in der Blutsäule (d.h. mit dem möglichen Austreten von Plättchen und gerinnungsaktiven Substanzen in die plasmatische Randzone), die von entscheidender Wichtigkeit sind (19, 107). Allerdings wird seitens der Morphologen nicht von allen Autoren eine Endothelläsion als notwendig erachtet (Aschoff (5), Werthemann, Rutishauer (107)) von den meisten jedoch gefordert (Borgström, Gelin, Zederfeldt (10), Raeburn (83)). Nach MacLacilin und Peterson (61) ist eine venöse Stase in den Venen des Beckens und der unteren Extremitäten für die Entstehung der Thrombose entscheidender als primäre Veränderungen der Venenwände oder Störungen im Blutgerinnungssystem. Da sich solche Stasen besonders leicht in der Tiefe von Venenklappen entwickeln, nehmen die Venenthrombosen gewöhnlich von hier ihren Ausgang.

Daß Thromben auch ohne Gefäßwandläsion entstehen können, ist hinlänglich am Beispiel der blanden Fernthrombose bekannt. Infolge der relativ kurzlebigen Natur einzelner Gerinnungsfaktoren muß an einen ständigen intravasalen Gerinnungsvorgang gedacht werden, der diese Faktoren verbraucht. Dazu gehört auch die latente visköse Metamorphose der Thrombocyten. Perlick (74) spricht von einer unterschwelliger Gerinnung. In gleicher Weise müssen sich die Hemmfaktoren der Gerinnung, insbesondere die Faktoren des fibrinolytischen Systems, an den latenten Vorgängen betei-

ligen, um ein Gleichgewicht herzustellen. Kommt es zu Störungen dieser physiologischen Wechselwirkungen, z.B. zu einer verminderten fibrinolytischen Aktivität, so werden sich Fibringerinnsel bilden, die Ausgangspunkt der blanden Fernthrombose sein können. Diese Auffassung widerlegt auch die Behauptung, daß kein Gerinnungsthrombus ohne weißen Agglutinationskopf entstehen könne.

Perlick (74), (ebenso Müller (69)) glaubt, den letztlich auslösenden Gerinnungsanlaß in Veränderungen des Zetapotentials, also der elektrostatischen Potentialdifferenz zwischen den Gefäßwandschichten und den Blutbestandteilen zu sehen. Ebenso hält er eine intermolekulare Veränderung des Zetapotentials innerhalb der Blutzellen oder plasmatischen Gerinnungsfaktoren für möglich.

Aus der großen Zahl der Begleitumstände, die den humoralen Faktor im Sinne einer Hyperkoagulabilität beeinflussen können, wie z.B. Ausschüttung von Histamin und verwandten Substanzen, Erregertoxinen, Heparinmangel, Dys- und Paraproteinosen, Veränderungen im fibrinolytischen System, Störungen im Gerinnungssystem selbst usw., soll seine Empfindlichkeit gegenüber einer Erhöhung der Blutfette besonders betont werden. Neben der wahrscheinlich direkten Einwirkung der Lipide, insbesondere der Phosphatide, auf den Blutgerinnungsmechanismus sei an das Phänomen des blood-sludge (Knisely 51) erinnert. Nach den Untersuchungen von Harders (44) und Swank (97,98) kann die reversible, intravasale Aggregation von Erythrocyten im Gefolge einer alimentären Lipämie zu erheblicher Verlangsamung der Blutströmung führen. Dies wirkt sich besonders nachteilig in Gefäßen mit engen Lumina aus. Die Verlangsamung ist dabei hauptsächlich auf eine Steigerung der Viskosität zurückzuführen. Swank (98) zeigte, daß die Aggregation der Erythrocyten und die gleichzeitig gesteigerte Adhärenz an der Gefäßwand auf einer klebrigen, zähflüssigen Hüllenbildung der Erythrocytenoberfläche beruht. Gleiches nahm er für die Thrombocyten an, die ebenfalls eine Aggregationsneigung zeigen. Perlick (74) glaubt in den Phosphatiden die Ursache für

die gesteigerte Adhäsionsneigung der Thrombocyten und Erythrocyten zu sehen. Der Bildung von Thromben dürfte damit Vorschub geleistet werden.

In den letzten Jahren wurde von verschiedenen Autoren (Bauditsch, Thomalske, Fleck, Wood u.a. zit. bei Braunsteiner (15)) auf die Klebefähigkeit oder Agglomeration der Leucocyten hingewiesen. (Streng zu unterscheiden von der blutgruppenspezifischen Agglutination). Diese Neigung zur Agglomeration sei unter gewissen Umständen wie z.B. bei Entzündungsvorgängen, in der Schwangerschaft oder nach Operationstraumen erhöht. Inwieweit diese Klebrigkeit aktiv produzierbar oder aber erworben ist, muß dahingestellt bleiben.

Der Vergleich mit dem schon länger bekannten blood-sludge-Phänomen drängt sich von selbst auf: es muß an ein allgemein gültiges Prinzip unter den Blutzellen gedacht werden. Bezüglich der Leukergie denkt Braunsteiner an eine zellulär gebundene unspezifische Abwehrmaßnahme des Organismus, welche dieser bei Belastungen durchführt.

Ob die Faktoren, die die Aggregation der Erythrocyten und der Thrombocyten bewirken, mit denen identisch sind, die die Agglomeration der Leucocyten hervorrufen, ist ungeklärt, aber durchaus möglich.

Neben dem blood-sludge-Phänomen wird an die Existenz von Chylomikronen und deren signifikante Vermehrung nach Fettbelastungen und bei bestehender essentieller Hyperlipämie erinnert. Chylomikronen, die in die Reihe der langsam wandernden großmolekularen β -Lipoproteide (89,75) einzuordnen sind, haben schwankende Größen zwischen $0,3 - 1\mu$. Ihre Zahl bewegt sich in Nüchternseren um 3 Mill/mm^3 , nach Fettbelastungen ($0,5\text{g Butter/kg Körpergewicht}$) steigen sie auf das rund 10fache an (Jobst 47). Sie sind dank ihres hohen Lipidgehaltes (98-100%) mit histochemischen Methoden (Färbung mit Scharlachrot, Sudanschwarz B) gut nachzuweisen. In Hinblick auf die Ergebnisse von Poole (77) und Mitarbeitern (78-80,85), nach denen die Chylomikronen auf Grund ihres Gehaltes an Phosphatiden aktiv an der Gerinnung teil-

nehmen, sollen diese bei den anschließenden Untersuchungen besonders berücksichtigt werden.

Ausführung:

Die Auswahl der Thromben erfolgte nach folgenden Gesichtspunkten:

1. Es mußten Beispiele für alle drei Erscheinungsformen gefunden werden: für den Agglutinationsthrombus, den Gerinnungsthrombus und ihre Kombinationsformen. Ferner wurden postmortal entstandene Gerinnsel (Speckhaut- und Cruorgerinnsel) in die Untersuchungsreihe einbezogen.
2. Es wurden nur die Thromben ausgesucht, die sich leicht von der Gefäßwand lösen ließen (dies betrifft insbesondere den Agglutinationsthrombus), um Fälle bereits stattgefundener Beeinflussung durch die Gefäßwand infolge voranschreitender Organisation oder durch lipoidige Umwandlung derselben, etwa in Form von Atherombeeten, möglichst auszuschließen.

Bei der anschließenden Teilung der Thromben (in einen größeren Teil zur chemischen Analyse und einen kleineren Teil zur histologischen Untersuchung) wurde darauf geachtet, die morphologischen Eigenheiten des einzelnen Thrombus in beiden Proben in gleichem Maße zu erhalten. Dies war für den gemischten Thrombus und den roten Thrombus mit weißem Kopf von besonderer Wichtigkeit.

Bis auf eine Ausnahme (pulmonale Embolie) fanden sich die Thromben an typischen Stellen: in den Venae iliacae, femorales und femoris profundae, sowie in verschiedenen Abschnitten der Aorta. Zwei Thromben wurden jeweils im linken Ventrikel gefunden. In einigen Fällen wurden einer Leiche zwei Thromben entnommen, wenn sich diese in ihrer Morphologie und Lokalisation voneinander unterschieden. Die Thromben verursachten bis auf den einen Fall von Lungenembolie niemals den Tod, sondern waren immer nur Ausdruck einer von

der Todesursache unabhängigen Thrombose.

Der für die histologische Untersuchung vorgesehene Thrombenanteil wurde in 10%igem Formalin nicht länger als nötig fixiert (12-24 Stunden), um unerwünschte Nebenwirkungen wie eine allgemeine Abschwächung der Farbtintensität und mögliche Extraktion von Lipiden zu vermeiden (Sinapius 96). Chayen (22) bewies mit gas- und papierchromatographischen Analysen, daß Fette, insbesondere Fettsäuren, beim Fixieren in das Formalin übergehen. Nach Ablauf von 24 Stunden wurde das Thrombenmaterial weitere 24 Stunden unter fließendem Wasser gespült und in Gelatine bzw. Paraffin eingebettet. Die Einbettung in 24%iger Gelatine (gelöst in 1%igem Karbolwasser) nach dem Verfahren von Gaskell, modifiziert nach Gräff (zit. bei Romeis 87) hat sich für alle leicht zerreißbaren Gewebe gut bewährt. Schrumpfungerscheinungen werden weitgehend vermieden. Die eingebetteten Thrombenstücke wurden zur vollkommenen Härtung weitere 1-2 Tage in 10%igem Formalin aufbewahrt. Die Färbung der Gefrierschnitte (10 μ dick) erfolgte mit Scharlachrot nach Michaelis (zit. bei Romeis 87) nach vorausgehender Haematoxylinkernfärbung sowie mit Sudanschwarz B nach Lison (zit. bei Romeis) mit anschließender Kernechtrotfärbung. Die Schnitte wurden in säurefreier Glyceringelatine eingedeckt. Ferner wurde eine Haemalaun-Eosin-Färbung (87) am Paraffinschnitt durchgeführt, die neben der Fettfärbung der allgemeinen Übersicht und Orientierung dienen sollte.

Angeregt durch Jochims (48) wurde eine Zusatzfärbung durchgeführt, wobei Leukocyten im Ausstrich mit Sudanschwarz B vorgefärbt und mit Giemsa-Gemisch nachdifferenziert wurden. Diese Methode wurde mit Rücksicht auf den Gefrierschnitt geringfügig modifiziert (87).

Sämtliche Färbungen erfolgten nicht - wie meist angegeben - in 70%igem-, sondern in 50%igem Alkohol, um Lipidextraktionen weitgehend zu vermeiden.

Ergebnis und Diskussion:

1) Morphologie des Thrombus an Hand von H-E Schnitten:

Der grundsätzlich unterschiedliche Bau des Gerinnungs- und Abscheidungsthrombus soll kurz dargelegt werden:

Regelmäßig wird die Entstehung eines Abscheidungsthrombus durch die Agglutination von Thrombocyten eingeleitet, die sich an der (lädierten) Gefäßwand festsetzen. So finden wir die agglutinierten Plättchen in Lamellensystemen, mehr oder weniger parallel ausgerichtet, an der Gefäßwand hintereinander angeordnet vor. Sie verlaufen schief oder quer zur Längsachse des Gefäßes und wachsen auch in die Lichtung hinein. An den Rändern haben sich in dichten Reihen Leucocyten abgelagert und in den noch verbliebenen Spalträumen ein Fibrinestrich entwickelt.

Der weiße Thrombus ist trocken, körnig, unelastisch und zerbrechlich und erscheint an seiner Oberfläche oft geriffelt. Er wächst solange appositionell, bis sich die Blutströmungsverhältnisse ändern. Bei plötzlicher Verlangsamung, Wirbelbildung oder gar durch Sistieren des Blutes kommt es zum Ausfall von Fibrin, induziert durch die schon erhöhte Gerinnungsbereitschaft und mit den gleichfalls ausfallenden Erythrocyten zur Bildung des roten Thrombus. So setzt sich die häufigste Form eines Thrombus mit dem primären weißen Agglutinationskopf und dem mehr oder weniger langen roten Koagulationsschwanz von proximal nach distal fort. Nicht selten kommt es zur Bildung von mehreren weißen Kopfteilen hintereinander, die nachträglich von roten Schwanzteilen verbunden werden. (Intermittierendes Wachstum nach Brass (14)). Häufig finden wir auch eine lamelläre Schichtung roter und weißer Anteile in engem Verband. Der rein-rote Thrombus zeigt mehr oder weniger Übereinstimmung mit dem postmortalen Cruorgerinnsel. Er ist jedoch infolge der Fibrinanteile von etwas festerer Konsistenz und weniger elastisch. Je jünger ein roter Thrombus ist, desto weniger unterscheidet er sich vom Cruorgerinnsel.

Speckhaut- und Cruorgerinnsel sind postmortale Gebilde.

Cruorgerinnsel verkörpern die erstarrte Blutsäule mit all ihren Elementen, während Speckhautgerinnsel aus Fibrinnetzen bestehen, in deren Maschen einige wenige Erythrocyten und Leucocyten eingelagert sind. Das Vorhandensein von Gerinnseln deutet immer auf ein protrahiertes Sterben hin, in dessen Verlauf das Blut nicht mehr oder nur sehr wenig bewegt wird. Je langsamer der Tod eintritt, umso mehr neigt das Blut dazu, sich in seine flüssigen und korpuskulären Bestandteile aufzutrennen, die dann post mortem getrennt gerinnen. Können die Erythrocyten noch sedimentieren, so wird sich dies im Auftreten von S peckhautgerinnseln äußern. Nach Letterer (58) beruht die postmortale Gerinnung auf einer fermentativen Wirkung der inzwischen aus zerfallenden Geweben und Blutkörperchen frei gewordenen Thrombokinasen. Bei raschem Zerfall entsteht Cruor, bei langsamerem S peckhautgerinnsel, das durch die einsetzende Fibrinretraktion das Serum bereits ausgetrieben hat. Dem postmortalen Gerinnungsvorgang wirkt gleichzeitig eine recht aktive postmortale Fibrinolyse entgegen, die das gebildete Fibrin aufzulösen vermag und damit die Gerinnsel rasch zum Schwund bringen kann. Makroskopisch füllen die Gerinnsel als rote bzw. gelb-speckige Ausgüsse die Gefäße und besonders das rechte Herz aus, sind elastisch und haben eine glatte, feucht-spiegelnde Oberfläche.

Die Bestimmung des Alters eines Thrombus macht gewisse Schwierigkeiten. Palpatorisch lassen sich gewisse Unterschiede in der Konsistenz feststellen. Frische rote Thromben sind relativ elastisch und feucht glänzend, ältere Thromben wirken infolge des inzwischen eingetretenen Wasserverlustes fester und in ihrem Volumen vermindert. Bedingt durch den gleichzeitig erfolgenden Haemoglobinabbau, sind sie von rostbrauner Farbe.

Auf die weißen Thromben lassen sich diese Verhältnisse nicht ohne weiteres übertragen, da deren Struktur grundsätzlich eine andere ist. Der frische, weiße Thrombus zeichnet sich durch körnigen Zerfall der Thrombocyten und Anlagerung von Leucocyten aus (107). Bald erfolgt die Hyalinisierung der Plätt-

chen und die Retraktion - induziert durch das Plättchen-Retraktocym - des vorhandenen Fibrinnetzes. Dabei wird Wasser abgegeben. Bei starken Leucocytenansammlungen können Teile der Thromben infolge fermentativer Einwirkung proteolytisch aufgelöst werden (puriforme Erweichung). Dieser auto- und heterolytische Vorgang setzt in den zentralen Thrombenanteilen zuerst ein. In der Regel erkennt man jedoch das Alter des weißen Thrombus am Grad seiner Organisation durch die Gefäßwand. Die Organisation ist u.a. vom Umfang der Anlagerung des Thrombus an die Gefäßwand abhängig. Breit anliegende Thromben werden am ehesten der Organisation anheimfallen: die Intima und die bindegewebigen Bestandteile der innersten Schichten der Media senden Fibroblasten aus, die gleichzeitig mit den Kapillarsprossen aus Adventitia und Media in den Thrombus eindringen. Aus den neu gebildeten Gefäßen wandern spärlich Leucocyten aus. Freie Wanderzellen (Histiozyten) und Kapillarendothelien vervollständigen das bunte Bild der in den Thrombus eindringenden Elemente. Die einsprießenden Mesenchymzellen wirken resorptiv und lytisch. Im selben Maße wie der Abbau von Zellen vor sich geht, werden diese durch bindegewebiges Material ersetzt. Raeburn (83), Werthemann und Rutishauser (107) zeigten, daß Fibroblasten schon innerhalb der ersten 4 Tage einwandern. Gleichzeitig breitet sich Endothel über die Oberfläche des Thrombus aus. Ein wirklich festes Haften an der Gefäßwand wird jedoch nicht vor Ablauf einer Woche erreicht (107).

Wie schon vermerkt, wurden möglichst frische Thromben, d.h. leicht ablösbare, zur Untersuchung ausgewählt. Trotzdem muß man bei den Agglutinationsthromben u.U. mit Kapillarsprossungen aus der Gefäßwand rechnen.

Friedemann und Beyers (37) zeigten im Tierversuch an experimentell erzeugten Thromben mit frisch entwickelter Kapillarisation deren hohe Durchlässigkeitsquote sowohl für Farbstoffe als auch für Blutlipide (!). Wurden die Tiere mit einer an Triglyceriden und Cholesterin reichen Diät gefüttert, so enthielten die geprüften Thromben große Mengen

an sudanophilem Material. Wahrscheinlich handelt es sich dabei nicht nur um passive Speicherungs-, sondern auch um aktive Stoffwechselvorgänge. Bei der histologischen und chemischen Analyse von in Organisation befindlichen weißen Thromben wird man diese zusätzliche Lipidquelle berücksichtigen müssen.

2) Ergebnis der Fettfärbungen

Die gebräuchlichen Fettfärbemethoden sind keine spezifischen Färbungen, und haben nichts mit einer chemischen Reaktion zu tun. (Boehringhaus, Escher, Kaufmann, Lehmann, Lison zit. bei F. Roulet 88). Dies gilt auch für die Baker'sche Chromierungsmethode, die teilweise als spezifisch für Phosphatide und phosphatidhaltige Gemische angesehen wird (Bloom, Wislocki 7). Nach Sinapius (96) nämlich werden neben den Lipiden auch andere Substanzen, insbesondere Proteine, chromiert.

Weiter muß bei Fettfärbungen immer berücksichtigt werden, daß in den Präparaten nur ein Teil der Fette dargestellt wird, der übrige Teil ist an Eiweiß gebunden und somit "maskiert". Daneben ist die mögliche störende Wirkung von Formalin auf Fettsubstanzen zu diskutieren. Eine Fettfärbung kann daher nur eine Übersicht verschaffen, jedoch kein quantitativer Gradmesser sein!

In einer kritischen Übersicht mit vorausgegangenen Versuchen an Modellen stufen Lennart und Weitzel (57) die gebräuchlichen Färbemethoden bezüglich ihrer Färbequalitäten wie folgt ein:

Gegenüber dem Nilblausulfat erfassen die Scharlachrot- bzw. Sudan III - Färbungen einen etwas eingeschränkteren Bereich. Immerhin werden Triglyceride, freie Fettsäuren und Fettsäureester von der Kettenlänge C_{11} an und die flüssigen Wachse sicher gefärbt. Ferner werden die Phosphatide, Cerebroside so gut wie vollständig erfaßt. Für normale Fettuntersuchungen ist das Scharlachrot dem Nilblausulfat vorzuziehen, da neben dem Vorteil der schnellen Durchführung

brillante Darstellungen erzielt werden.

Sudanschwarz B hat einen etwas größeren Färbebereich als Scharlachrot. Nach Romeis (87) "färbt es außerdem noch Fett-tropfen an, die den gewöhnlichen Sudan III - und Scharlach-rotfärbungen entgehen." Wahrscheinlich sind hiermit die Chylomikronen gemeint, die sich nach Bschor (17) ohne Zwei-fel mit Sudan Schwarz B kräftig anfärben lassen.

Bei der Durchsicht der mit Scharlachrot gefärbten Präparate fallen in allen Abschnitten, besonders aber in den roten Thrombenanteilen, schwarz gefärbte Granula auf, bei denen es sich sehr wahrscheinlich um Formalinpigmente handelt. Diese Pigmente sind insofern störend, als sie die Beurtei-lung der schwarz angefärbten Lipide in den mit Sudan Schwarz B behandelten Präparaten erschweren. Die Versuche; die Pig-mente durch Einwirken einer 1-5%igen Ammoniumhydroxydlösung in 70%igem Alkohol (Kardasewitsch bei Romeis 87), bzw. durch Schwenken in einem Gemisch einer 1%igen wässrigen Kalilauge mit 80%igem Alkohol (1:100 V.T.) (Verocay bei Romeis 87) zu entfernen, sind nicht zufriedenstellend gelungen. Die Ex-traktion von Fetten ist dabei erheblich, und die leicht zerreißbaren Schnitte leiden unter der verlängerten Proze-dur. Wird niederprozentiger Alkohol (50%) verwendet, so werden die Pigmente nicht einwandfrei entfernt.

Die an die Sudanschwarzfärbung angeschlossene Leucocyten-differenzierung nach Giemsa hat sich am Gefrierschnitt nicht bewährt, da durch die dichte Lagerung der Leucocyten die Kerndifferenzierung erschwert wird. Die lipophilen Gra-nula sind gut zu sehen, werden jedoch auch von der gewöhn-lichen Fettfärbung sicher erfaßt.

3) Lipidgehalt der Thromben an Hand der mit Sudan-Schwarz B und Scharlachrot gefärbten Präparate

Bei der Untersuchung erwies es sich als zweckmäßig, die ge-geprüften Thromben in lipidarme, lipidhaltige und lipid-reiche Thromben einzuordnen. Ohne Ausnahme mußten die

Cruorgerinnsel, die roten Thromben und die roten Anteile der gemischten Thromben als äußerst lipidarm bezeichnet werden. Die Speckhautgerinnsel, die weißen Anteile der gemischten Thromben und die weißen Thromben konnten in die Reihe der lipidhaltigen, bzw. lipidreichen eingestuft werden. Besonders deutlich lassen sich die quantitativ so unterschiedlichen Lipidablagerungen an den gemischten Thromben zeigen. Rote fettarme Anteile wechseln mit teilweise stark lipidhaltigen weißen Anteilen ab. Die Lipide werden teils intra-, teils extrazellulär vorgefunden.

a) Intrazelluläre Lokalisation:

Schon bei Lupenbetrachtung fallen einzelne, mehr oder weniger mit sudanophilem Material beladene kernhaltige Zellen auf. Bei stärkerer Vergrößerung finden sich die gefärbten Partikel entweder als im Cytoplasma fein verteilte Granula wieder oder als größere zusammengefllossene Tropfen, die den Kern der Zelle an die Wand drücken. Ungeachtet der Tatsache, daß sich in den Strukturen aller Blutzellen (mit Ausnahme der Lymphocyten) lipoidige Substanzen, insbesondere Phosphatide, nachweisen lassen (Bloom und Wislocki (7), Braunsteiner 15)), handelt es sich hier zweifellos um eine zusätzliche Lipidspeicherung. Dafür sprechen das relativ seltene Auftreten derartiger Zellen und die Menge der Lipide. Die theoretisch sudanophile Empfindlichkeit aller Blutzellen ist so diskret, daß sie in den relativ dicken Schichten nicht nachgewiesen werden kann.

Die intrazelluläre Speicherung kommt auf Grund der Phagozytose-tätigkeit einzelner Zellen, vor allem polymorphkerniger Leucocyten, zustande.

Vereinbarungsgemäß wird dann von Phagozytose gesprochen, wenn eine intrazelluläre Aufnahme von Teilchen erfolgt, die größer als 1000 Å und damit lichtmikroskopisch sichtbar sind (Hirsch 45). Geht man davon aus, daß die zu phagozytierenden Partikel in freier Form und in entsprechender Größe vorliegen, so wird sich eine Phagozytose-tätigkeit überall dort einstellen, wo die dazu befähigten Blutzellen

in genügender Zahl vorliegen bzw. herangeholt werden können, und die Zeit zur Phagozytose genügend lang ist. Diese Voraussetzungen liegen bei dem weißen Anteil der Thromben in erhöhtem Maße vor. Dementsprechend finden wir hier den intrazellulären Speicherungstyp relativ häufig.

Unter den Blutzellen sind die polymorphkernigen Leucocyten und die Monocyten zur Phagozytose befähigt. Die Annahme, Lymphocyten könnten nicht phagozytieren, ist heute nicht mehr mit Sicherheit zu vertreten (Braunsteiner 15). Die Untersuchungen sind jedoch noch nicht abgeschlossen.

Jochims (48) zeigte, daß sich der Fettgehalt der polymorphkernigen Leucocyten auffällig nach dem jeweiligen Plasmalipidspiegel richtet. Leucocyten, die lipämischem Plasma entnommen werden, vermögen in vitro weniger Lipide aufzunehmen als solche, die Nüchternblut entstammen. Sie sind bereits mit Fett gesättigt. Den Analysen Boyds (12) zufolge beträgt der mittlere Gesamtlipidgehalt menschlicher Leucocyten 1710 mg/100 g mit einer Standardabweichung von 734 mg oder 42,8% vom Mittelwert. Burt und Rossiter (20) erhielten ähnliche Werte an Kaninchen-Leucocyten (1765 $\pm$ 110 mg/100 g). Die starken Schwankungen sind wahrscheinlich mit dem erwähnten Phänomen der Phagozytose zu erklären. Auffallend ist der hohe Anteil der Phosphatide an den Gesamtlipiden. Mit 47% (Boyd) kommt er dem Phospholipidgehalt der Erythrocyten (54% - 57% Pankred 81) nahe. Die Phosphatide dürften großenteils ein normaler Bestandteil der leucocytären Struktur sein, - Vercauteren hält besonders die Hülle der Granula für phosphatidreich - (zit. bei Braunsteiner 25), andererseits ist eine Speicherung auch von Phosphatiden durch Phagozytose nicht von der Hand zu weisen.

Die phagozytierende Eigenschaft der polymorphkernigen Leucocyten und der Monocyten dürfte wegen ihrer relativ kleinen Zahl im strömenden Blut kaum von Bedeutung sein. Dies ändert sich bei Entzündungsvorgängen an der Gefäßwand, die häufig zu Thrombosen disponieren. Im Zuge der einsetzenden Abwehrreaktionen des Organismus sammeln sich in vermehr-

tem Maße Leucocyten an der geschädigten Stelle. Wieweit sie hier ihre phagozytierenden Funktionen ausüben können, hängt von der Art des aufzunehmenden Materials und von ihrem eigenen Füllungszustand ab. Die Phagozytose kann in kurzer Zeit mehrfach wiederholt werden. Während die kurzlebigen neutrophilen Granulocyten bald untergehen, ist die Lebenszeit der Monocyten wesentlich länger bemessen.

Gleiche Phagozytoseverhältnisse könnten auch für die weißen Thromben mit ihrem relativ hohen Gehalt an Leucocyten im Vergleich zu anderen Geweben gelten. Der augenblickliche Plasmafettspiegel wird sich unmittelbar auf den Gesamtlipidgehalt der Leucocyten und damit auch auf den der weißen Thromben auswirken. Selbstverständlich läßt sich mit morphologischen Mitteln nicht exakt feststellen, wieweit der sudanophile Gehalt der angelagerten Leucocyten auf Lipide plasmatischer Herkunft oder auf nachträglicher Phagozytose von freiliegenden Fettpartikeln aus dem Bereich des Thrombus beruht. Eher läßt sich der Umfang der Phagozytose abschätzen, wenn man die auf dem Wege der bindegewebigen Organisation in den Thrombus einwachsenden phagozytierenden Zellen wie Histiocyten, Fibrocyten und Gefäßendothelien berücksichtigt. Ebenso können über neu entstandene Kapillarsprossungen weitere Monocyten und Leucocyten in den Thrombus gelangen. So sehen wir eine große Anzahl von fetthaltigen Zellen um einzelne Kapillarschläuche angeordnet. Hier ist eine sekundäre Phagozytose Tätigkeit denkbar. Die morphologischen Unterschiede zwischen Blutmonocyten und Histiocyten lassen sich allerdings nach 2 Tagen nicht mehr feststellen. Nach Wood (zit. bei Braunsteiner 15) zeigen die Leucocyten eine besondere Aktivität, wenn sie die zu phagozytierenden Partikel gegen eine feste Wand drücken können, wie es in Thromben der Fall ist. (Oberflächenphagozytose).

Hirsch nahm für die Phagozytosefähigkeit mobiler Zellen eine Partikelgröße von mindestens $10\text{ m}\mu$ an.

Braunsteiner fordert für die der fixen reticulo-endothelialen Zellen eine Partikelgröße von $1-500\text{ m}\mu$.

Die großmolekularen β -Globuline, an die 75% der Plasmalipide gekoppelt sind, haben eine Größenordnung von ca. $1,8 \text{ m}\mu$. (French, Morris, Robinson 36), liegen also weit unter der geforderten Minimalgrenze. Chylomikronen hingegen werden in die Größenordnung von $300 \text{ m}\mu$ bis $1000 \text{ m}\mu$ eingestuft. Die kleinsten Chylomikronen könnten demnach sehr wohl vom reticulo-endothelialen System phagozytiert werden. Abgesehen davon, daß es wahrscheinlich noch kleinere Chylomikronen gibt, die sich dem licht-mikroskopischen Bereich entziehen (Bschor (17) spricht von sudanophilem, optisch homogenem Plasma), weisen French, Morris und Robinson auf die erstaunlich kurze Halbwertszeit der Chylomikronen im Plasma hin. Schettler, Eggstein, Jobst (90) fanden nach intravenöser Applikation markierter Chylomikronen an Ratten und Hunden nach 10 Minuten nur noch die Hälfte der ursprünglich vorhandenen Chylomikronen vor. Die amerikanischen Autoren vermuten eine umfangreiche Hydrolyse der Chylomikronen, die ihr Verschwinden aus dem Plasma ermöglicht. Solche "degraded" Chylomikronenpartikel fallen wahrscheinlich noch eher der Phagozytose anheim.

An dieser Stelle muß darauf hingewiesen werden, daß das Verschwinden von Chylomikronen aus dem Blut nur im geringen Maße der Phagozytosefähigkeit von fixen und beweglichen Zellen zuzuschreiben ist. Vielmehr scheint der Hauptabbauweg der der Filtration und Diffusion durch die Gefäßwand nach vorausgegangener Hydrolyse bzw. Überführung in eine löslichere Form zu sein (36).

b) Extrazelluläre Lokalisation:

Der extrazelluläre Ablagerungstyp der Lipide spielt relativ wie absolut gesehen die dominierende Rolle. Wir können eine Verteilung in feine und feinste Partikelchen, deren Größe weit unter der der weißen bzw. roten Blutkörperchen liegt, von klein- und großtropfigen Ausfällungen unterscheiden. Regelmäßig erscheint das fein verteilte Fett über ein bestimmtes Gebiet des Thrombus gleichmäßig ver-

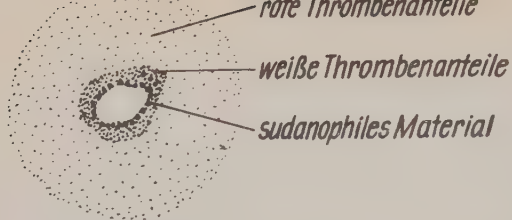
streut, während die größeren Lipidtropfen in typischen Anordnungen vorliegen.

Bezüglich der kleineren Partikel in der Größenordnung um 1μ stimmen wir mit Bschor (17) überein, der sie als Chylomikronen anspricht. Wir finden sie einzeln oder zu dichten Häufchen zusammengelagert vor, zum Teil umgeben sie aneinandergereiht eine größere Zelle, einen Erythrocyten oder einen Leucocyten. Reinrote Thromben enthalten - wenn man in ihnen überhaupt Fett nachweisen kann - nur Lipidartikel in einer Größe, die wir als Chylomikronen ansprechen.

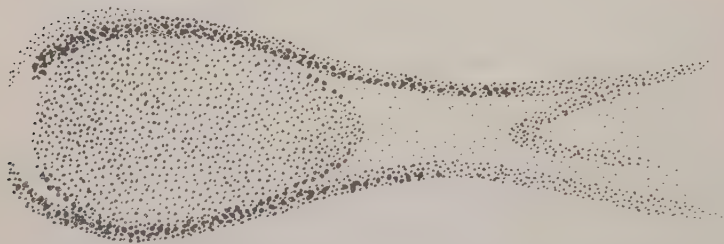
Der quantitativ weitaus größte Teil der Lipide findet sich jedoch in den großtropfigen Lipidniederschlägen. Ihre Größe schwankt zwischen $1 - 50\mu$. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um größere Chylomikronenkonglomerate, deren ursprüngliche Grenzen nicht mehr zu erkennen sind. Möglicherweise sind sie infolge einer Änderung der Oberflächenverhältnisse zu einem großen Tropfen zusammengefloßen.

Die Ablagerung erfolgte offensichtlich nach einem bestimmten Modus und soll an Hand von schematisierten Zeichnungen einiger Thromben erläutert werden:

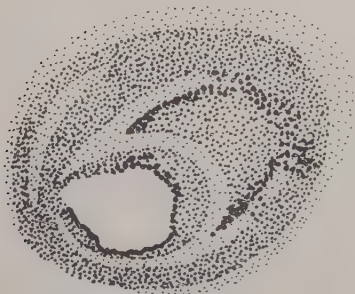
Besonders typisch ist die Anordnung in einem schmalen Saum, der je nach Schnittführung den strukturellen Grenzen des Thrombus folgend verläuft. Es ist mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß die Ablagerung einer derartigen Schicht mit einem Mal (also nicht mehrzeitig) erfolgte. Größe und Gestalt des im Moment der Lipid-Ablagerung bereits bestehenden Thrombus ist dem Verlauf der sudanophilen Schicht direkt abzulesen. Es sei besonders auf den Thrombus 13 verwiesen, der dem linken Ventrikel eines Verstorbenen entnommen wurde und als Präzedenzfall für den lamellenartigen Aufbau eines rein weißen Abscheidungsthrombus gelten darf. Jeweils an der Grenze zwischen Thrombocytenausfällungen und Fibrinespinst, dort, wo ein dichter Saum von Leucocyten besteht, finden sich auch die Lipidpartikel in wechselnder Größe und Gestalt abgelagert.



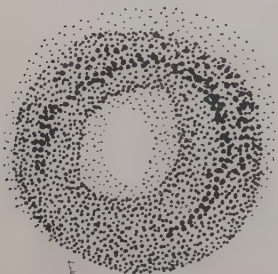
Thrombus 3
 (Querschnitt)



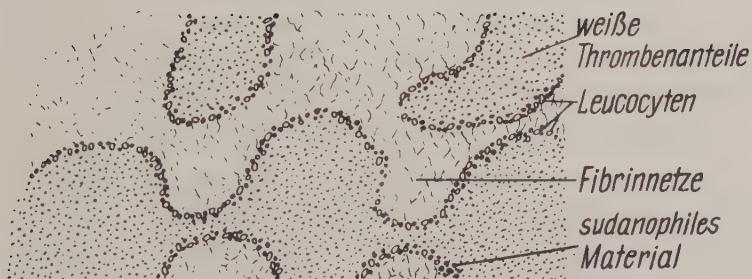
Thrombus 5
 (Längsschnitt)



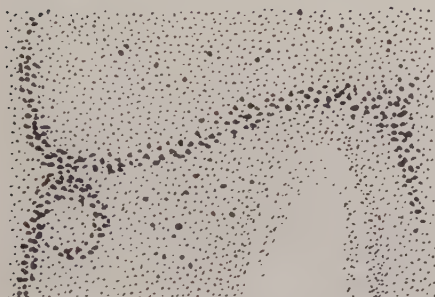
Thrombus 8
 (Querschnitt)



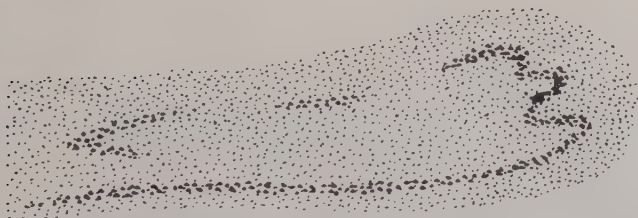
Thrombus 9
 (Querschnitt)



Thrombus 13
(Querschnitt)



Thrombus 18
(Querschnitt)



Thrombus 18
(Längsschnitt)

Die extrazelluläre Lipidablagerung ist von dem ständig sich ändernden Plasmalipidgehalt abhängig. In Zeiten starker Ansammlungen von Chylomikronen im Blut, wie z.B. bei einer alimentären Lipämie, schlagen sich diese vermehrt auf den Thrombus nieder. Gleichzeitig erfolgende Strömungsverlangsamungen des Blutes dürften dabei fördernd wirken.

Moreton (68) macht die ständig sich wiederholende Chylomikronenabscheidung an der Gefäßwand für die Ausbildung arteriosklerotischer Veränderungen mitverantwortlich. Der Theorie Moretons folgend ist der Niederschlag von Chylomikronen nicht auf den Thrombus allein beschränkt, sondern betrifft auch Abschnitte der Gefäßinnenwand. Während die Chylomikronen aber hier dank der physiologischen Vorgänge wie Hydrolyse, Phagozytose durch Zellen des retikulo-endothelialen Systems, Filtration, Diffusion und Insudation abgebaut, bzw. in die Gefäßwand aufgenommen werden, bleiben sie auf dem Thrombus zunächst liegen. Dies hat zur Folge, daß sie auf Grund ihres Gehaltes an gerinnungsphysiologisch-aktiven Substanzen weitere Thrombocyten- und Erythrocytenabscheidungen aus dem vorbeiströmenden Blut begünstigen. Bschor diskutiert in diesem Zusammenhang einen "örtlichen Sludge-Faktor."

Das Beispiel des parietalen Thrombus 13, dessen successiver, korallenstockartiger Plättchenaufbau durch den Ausfall von Leucocyten und Chylomikronen bedingt wird, ist besonders geeignet, den sich über Tage erstreckenden Bau zu demonstrieren.

Die Vielzahl der während dieser Zeit stattgehabten alimentären Überschwemmungen des Blutes durch Chylomikronen ist direkt abzulesen.

Die nebenstehende Zeichnung gibt die sudanophilen Ablagerungen des Thrombus 10 wieder, dessen große Fettmengen sich an einer einzigen Stelle niedergeschlagen haben. Das Fett ist strömungsgerecht abgelagert worden und liegt an der der Gefäßlichtung zugekehrten Thrombenseite. Wahr-



scheinlich sind auch gewisse Wirbelbildungen für die reichhaltige Ablagerung verantwortlich zu machen. Es ist leicht einzusehen, daß Strömungsrichtung und -geschwindigkeit durch die Anwesenheit eines Fremdkörpers, wie ihn ein Thrombus darstellt, beeinflußt werden. Abhängig von Form und Größe des Fremdkörpers werden sich außerdem Wirbel bilden, die zu einem verlängerten Kontakt des Blutes mit der Thrombenoberfläche führen und daher einen vermehrten Ausfall von Chylomikronen und damit auch von Thrombocyten und Erythrocyten zur Folge haben. Erhöhte Fettablagerungen und Dickenwachstum des Thrombus sind das morphologisch faßbare Ergebnis. Die Folgen abgelaufener Wirbelbildungen lassen sich auch im H.E.-Schnitt nachweisen, der an einer Stelle ein ganzes Bündel schlangenlinienförmig angeordneter Fibrinfasern zeigt.

Neben den Auswirkungen einer alimentären Lipämie auf den Lipidgehalt des Thrombus wird man an eine generell erhöhte Lipidkonzentration des Plasmas bei den Thromben denken müssen, die über ihre gesamte Fläche kleinste Lipidpartikel verteilt aufweisen (Thrombus 6, 18, 11). Inwieweit man diese Lipide zu den aktiven Faktoren im Gerinnungsgeschehen rechnen oder sie nur als sekundäre Ablagerungen auffassen darf, ist mit morphologischen Methoden nicht festzustellen. Hier sei auf Teil III der Ausführungen verwiesen.

c) Lipidsynthese

Die intra- und extrazellulären Ablagerungen entstammen lipoidigem Material, das in enger Beziehung zu Blutzellen, Fibrin und Gerinnungsfaktoren ausgefallen ist.

Neben der plasmatischen Herkunft der Lipide kann bei den weißen, teilweise schon in Organisierung begriffenen Thromben an die Möglichkeit einer zellständigen Lipidsynthese bzw. an ein Überströmen von in der Gefäßwand synthetisierten Lipiden in den Thrombus gedacht werden. Die hohe Permeabilitätsquote für Lipide bei jungen Geweben ist bereits erwähnt worden (37). 1949 wiesen Chernick (23) und Mitarbeiter in später häufig bestätigten Experimenten nach, daß

die Rattenaorta in der Lage ist , in vitro Phosphatide zu synthetisieren. Auch Cholesterin soll von Aortengeweben synthetisiert werden können. Nach Thannhauser (100) ist wahrscheinlich jede wachsende Zelle befähigt, Cholesterin neuzubilden, eine Eigenschaft, die jedoch bevorzugt den Retikulumzellen und den Histiocyten zukommt.

Bruns (16) wies in histochemischen und fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen am Aortenendothel relativ hohe Konzentrationen von Spingomyelingemischen nach, die in der Gefäßwand synthetisiert werden können. In welchem Ausmaß diese Synthesen vonstatten gehen, ist noch sehr umstritten. Schettler (89) erinnert in diesem Zusammenhang an die geringere Umsetzungsquote der Aorta und der arteriellen Gefäße für Lipide im Vergleich zu parenchymatösen Geweben.

Immerhin ist ein Austausch von vasomural synthetisierten Lipiden zwischen der Gefäßwand und dem mit ihr verbundenen Thrombus denkbar. Bei hohen Lipidkonzentrationen in weißen Thromben wird man an diese Möglichkeit denken müssen.

d) Fettphanerose

Das Phänomen der Fettphanerose in krankhaft veränderten Geweben, besonders aber in allen Phasen des Gewebsunterganges, der Nekrose, Nekrobiose, bei der Autolyse und Heterolyse ist hinreichend bekannt.

Thromben, rote wie weiße, sind vom Augenblick ihrer Entstehung an im Organismus auto- und heterolytischen Vorgängen unterworfen. Das hierbei sichtbar werdende Fett braucht also nicht unbedingt plasmatischer Natur oder aus der Gefäßwand diffundiert zu sein, sondern es kann sich auch um phanerotisches Struktur Fett der Blutzellen handeln, das von seinem Eiweißträger gelöst wurde. Es wäre denkbar, daß sich dieses Fett während der Retraktion des Fibringerinnsels und dank einer damit verbundenen gewissen Flüssigkeitsströmung an günstigen Stellen, z.B. an Strukturgrenzen, anreichert. Dieser Vorgang ist besonders im Falle des Agglutinationsthrombus Nr.13 zu diskutieren, dessen Ablagerungsmodus für diese Annahme sprechen könnte.

Es sei aber darauf hingewiesen, daß die Vorgänge der Fettphanerose keinen Einfluß auf die Ergebnisse der chemisch-quantitativen Analyse haben und daher auch keinen höheren Fettgehalt vortäuschen.

Teil II

- Chemische Untersuchung -

Die histologische Untersuchung läßt bezüglich der Lipidmengen eine grobe Einteilung in lipidarmer, lipidhaltige und lipidreiche Thromben zu. Weitere Differenzierungen sind nur mit Hilfe einer exakten, lipidchemischen Analyse möglich, die neben den quantitativen Ergebnissen auch die notwendige Kenntnis der qualitativen Relationen der Lipide erbringt.

Zu diesem Zweck werden die der chemischen Untersuchung zur Verfügung stehenden 18 Thrombenanteile je nach ihrer Morphologie in Speckhaut- und Cruorgerinnsel, rote, gemischte Thromben (in denen allerdings der weiße Anteil durchweg überwiegt) und schließlich rein weiße Thromben eingeteilt und durchlaufend nummeriert.

A. Quantitativer Teil

1) Methodik:

Die Extraktion der Lipide wird nach der von Folch (34) angegebenen Methode vorgenommen. Damit werden die Gesamtlipide, die wasserlöslichen Extraktionsstoffe, die extrahierten Thrombenrückstände und der Wassergehalt der einzelnen Thromben erfaßt.

Die Thrombenstücke bzw. die Gerinnsel werden sofort nach der Entnahme aus der Leiche gewogen, um den zum Teil erheblichen Wassergehalt noch vor dem Abfließen und dem Verdunsten zu berücksichtigen (dies trifft besonders auf die Speckhautgerinnsel zu). Die Stücke werden mit der Schere zerkleinert und in einem Chloroform-Methanol-Gemisch (2:1 V.T.) aufgefangen, dessen Volumen etwa das 12-15fache des Thrombengewichtes beträgt. Zur besseren Extraktion müssen die bereits zerkleinerten Thromben mittels eines Glasstabes so weit wie möglich homogenisiert werden. Das in Chloroform-Methanol-Gemisch aufgeschlämmte Thrombenmaterial wird nach der Extraktion 20 min lang abzentrifugiert. Das Sediment wird mehrmals mit Chloroform-Methanol nachge-

waschen, abzentrifugiert, mit Äthanol (zur späteren Äther-Äthanol-Extraktion) versetzt und unter CO_2 -Verschluß bei -15°C aufbewahrt. Die vereinigten Überstände werden durch Glaswolle filtriert (Papierfilter werden vermieden, da diese nach Hack (41) Kepheline zurückhalten) und mit Chloroform-Methanol (2:1 V.T.) auf das genau 20 fache Volumen des Ausgangsmaterials aufgefüllt. Das gesamte Filtrat wird in einen Scheidetrichter gegeben und mit $1/5$ des Volumens an destilliertem Wasser versetzt. Beim anschließenden Schütteln stellt sich fast immer eine milchige Trübung ein. Die Trennung der wasserlöslichen Extraktionsstoffe (Oberphase) von den Gesamtlipiden (Unterphase) ist meist in einigen Stunden abgeschlossen. Während dieser Zeit werden die Lösungen im Dunkeln aufbewahrt, um einer Oxydation der Lipidfettsäuren (Herb, Riemenschneider (84)) vorzubeugen.

Die Oberphase mit den wasserlöslichen Extraktionsstoffen wird bis zur Gewichtskonstanz völlig eingedampft, gewogen und verworfen. Die Unterphase mit den sauerstoff- und lichtempfindlichen Lipiden wird im Dunkeln bei -15°C aufbewahrt. Die quantitative Bestimmung des Lipidanteils ergibt sich nach Abzweigung eines aliquoten Teils, der eingedampft und anschließend gewogen wird. Das so gewonnene Fett zeigt sirupartige Beschaffenheit und wechselt vom hellsten Gelb bis zum dunklen Braun, je nach Gehalt der in ihm enthaltenen lipoidlöslichen Farbstoffe.

Das beschriebene Verfahren, das, wie Eggstein (30) in seiner kritischen Übersicht der Fettextraktionsmethoden ausführt, am ehesten geeignet ist, bei maximaler Lipidextraktion Verunreinigungen weitgehend zu vermeiden, soll durch eine zweite Methode ergänzt werden. Dies geschieht auf Empfehlung der Arbeitsgruppe Schettler, die eine restlose Extraktion der Lipide anstrebt. In einem anschließenden Arbeitsgang werden die Thrombenrückstände mit einem Äther-Äthanol-Gemisch (1:3 V.T.) nach Bloor (8) erneut extrahiert. Die bereits in Äther-Äthanol aufbewahrten Rückstände werden mit destilliertem Äther im entsprechenden Verhältnis versetzt. Die Destillation des Äthers erfolgte

nach vorheriger Behandlung mit Ferro-Sulfat zur Zerstörung der Peroxyde sowie dreimaligem Waschen mit Wasser im Scheidetrichter. Das Äther-Aethanol-Volumen soll das 20fache von dem der zu untersuchenden Extraktionsrückstände betragen (Bloor (8), Boyd (13)). Das Gemisch wird 30 min unter Rückfluß im Wasserbad gekocht, anschließend 20 min zentrifugiert und durch Glaswolle filtriert.

Kein organisches Lösungsmittelgemisch vermag Lipide selektiv zu lösen, ohne nicht auch einige Nichtlipidsubstanzen mitzuerfassen. Aus diesem Grund müssen die gewonnenen Rohextrakte nach dem Eindampfen rektifiziert werden, falls sie nicht wie die Chloroform-Methanol-Extrakte vorher mit Wasser ausgeschüttelt werden können. Boyd (13), Kirk, Page, Van Slyke (49) und Bloor (8) dampfen den Äther-Aethanol-Extrakt zur Trockne ein und nehmen den Rückstand in Petroläther auf. Wie unter anderen Folch und Van Slyke (35) nachwiesen, kann dieses Verfahren nicht als selektiv für die Lipidextraktionen angesehen werden, da die mitgelösten Verunreinigungen mengenmäßig bereits ins Gewicht fallen. Daneben soll sich ein erheblicher Lipidsubstanzverlust ergeben, der nach Eggstein (30) bis zu 25% betragen kann. Günstigere Ergebnisse erzielte Artom (4a), der die Reextraktion mit Chloroform durchführte. Folgt man den Angaben Artoms, so zeigt sich, daß nur ein geringer Teil des eingedampften Äther-Aethanol-Extraktes tatsächlich in Lösung geht, während der übrige im Glas verbleibt. Die in Chloroform gelösten Substanzen werden als Lipide angesprochen. Die Prüfung auf Cholesterin nach der Schnellmethode von Liebermann-Burchardt verläuft negativ, die auf Phosphor nach Fiske-Subarrow (33) schwach positiv. Die Substanzlösungen werden in Ampullen gefüllt, unter CO_2 eingeschmolzen und bei -15°C aufbewahrt. Der Rückstand von teils fester, teils sirupöser Beschaffenheit läßt sich vollständig in Wasser lösen. Die Prüfung auf Eiweiß (Kochprobe nach Ansäuerung mit verdünnter Essigsäure, sowie Heller'sche Ringprobe) verläuft negativ, die auf Zucker (Trommer'sche Probe) schwach positiv. Die sehr empfindliche Probe auf freie Aminosäuren durch

Kochen mit einer 0,25%igen wäßrigen Ninhydrinlösung ist stark positiv.

2) Ergebnisse und Bewertung

Die Mengen der mit der Bloor'schen Extraktionsmethode gewonnenen Substanzen sind sehr unterschiedlich. Sie schwanken zwischen 1 und 40 mg. Der tatsächliche Lipidgehalt der eingedampften Extrakte beträgt etwa 20%. Vergleicht man diese wenigen mg (siehe auch Tabelle I) mit der Menge des mit Chloroform extrahierten Fettes, so machen die mit der Bloor'schen Methode gewonnenen Fette nur 5% der Gesamtlipide aus. Bezüglich der Qualität der durch die Äther-Äthanol-Extraktion zusätzlich gewonnenen Lipide muß auf die später beschriebene Papier- und Säulenchromatographie verwiesen werden.

Der geringe Lipidgewinn läßt den Sinn der durchgeführten Zusatzextraktion fraglich erscheinen. Es muß der Eindruck entstehen, daß die Bloor'sche Äther-Äthanol-Extraktionsmethode, wenn sie im Anschluß an eine Chloroform-Methanol-Extraktion durchgeführt wird, im vermehrteren Maße Nichtlipide löst als bei ihrer ausschließlichen Verwendung. Als mögliche Ursachen sind die erhöhte Lösungsbereitschaft von Nichtlipiden durch den bereits vorausgegangenen Extraktionsprozeß und die bekannte Lösungsvermittlung der Phosphatide, wie sie von Folch und Van Slyke (35) erstmalig diskutiert worden sind, anzugeben. Bode und Ludwig (9) zeigten, daß mit steigenden Phosphatidmengen auch mehr Peptide in die Lipidextrakte gelangen. Daneben muß an eine zusätzliche Lösung von Stoffen gedacht werden, die bei längerem Kochen des Äther-Äthanol-Gemisches in den Extrakt gelangen. So hält Boyd (13) längeres Erhitzen von Blut bereits für unangebracht, da sich, wie er nachwies, sogar Serumfarbstoffe zusätzlich lösen können.

Hinsichtlich der Nichtlipidrückstände aus dem Äther-Äthanol-Extrakt sei auf folgende Befunde anderer Autoren verwiesen: Folch, Van Slyke (35) fanden nach Reextraktionen in Petroläther in ihren Lipidextrakten variable Mengen von Nicht-

lipiden wie Harnstoff, Glukose, Aminosäuren und organische Salze. Dabei fanden sie Harnstoff als den Hauptvertreter des vorhandenen nicht an Phosphatide gebundenen Stickstoffs. Christensen (24) wies ebenfalls Harnstoff und mit Hilfe der Ninhydrinprobe geringe Mengen von freien Aminosäuren nach. Wagener (106) konnte unter den ninhydrinpositiven Substanzen Phenylalanin, Leucin, Valin, Alanin, Taurin und Serin papierchromatigraphisch analysieren.

Die eigenen Ergebnisse lassen ebenfalls freie Aminosäuren vermuten, die möglicherweise z.T. in Form von kurzkettigen Peptiden vorliegen. Schrade, Becker und Böhle (94) diskutieren auf Grund der gefundenen Aminostickstoffverbindungen die Existenz von sogenannten Lipopeptiden. Die freien Aminosäuren seien als Spaltprodukte aufzufassen. Diese Ansicht ist widerlegt worden (9, 75,) da die vermutete Bindung mit Phosphatiden nicht bestand. Nicht anzuzweifeln ist jedoch die Existenz von Aminosäuren, die, entweder frei oder zu Peptiden verbunden, Verunreinigungen der Lipidextrakte darstellen.

Der schwach positive Ausfall der Trommer'schen Probe läßt auf den Gehalt des Rückstandes an Zucker schließen. Möglicherweise handelt es sich, wie schon Folch und Van Slyke vermuteten, um Glucose.

Dem Gewinn von zusätzlichen 5% Lipiden (bezogen auf die Gesamtlipidmenge) steht ein beträchtlicher Mehraufwand an Arbeit gegenüber. Die Methode Folchs kann als durchaus genügend angesehen werden, zumal die qualitative Zusammensetzung der Lipide aus der Bloor-Extraktion nicht wesentlich von der der Folch-Extraktion abweicht.

In der folgenden Tabelle (I) werden die Ergebnisse der Chloroform-Methanol-Extraktion aufgeführt. Die Lipidanteile der Äther-Äthanol-Extraktion (rund 1/5) sind vermerkt, sie sind auch in den Gesamtlipiden enthalten. Die Nichtlipide der Äther-Äthanol-Extraktion (rund 4/5) sind den wasserlöslichen Extraktionsstoffen der Chloroform-Methanol-Extraktion zugerechnet:

Tabelle I

Nr.	Art der Blutgerinnung	Frischgewicht	Trockengewicht	Gesamtlipide	Lipide der:		Nichtlipide:	
		(g)	(g)	(mg)	C-M Extr. (mg)	A-A Extr. 20% (mg)	wasserlösliche Extr. + 80% d. Ä-A Extr. (mg)	extr. Thrombenrückstände (mg)
1	Speckhaut	11,200	1,155	84,2	83	1,2	200,9	870
2	Speckhaut	4,550	1,719	96,7	92	4,7	192,5	1430
3	Cruor	4,910	1,463	45,3	43	2,3	52,1	1366
4	rote Thromben	7,720	2,243	56,1	55	1,1	76,7	2110
5	rote Thromben	1,000	0,169	7,2	7	0,2	16,9	145
6	rote Thromben	0,962	0,281	18,2	17	1,2	13,4	249
7	gemischte "	13,000	4,105	100,0	99	1,0	125,3	3880
8	gemischte "	6,260	1,277	86,8	86	0,8	49,2	1141
9	gemischte "	10,020	2,272	165,4	163	2,4	117,1	1989
10	gemischte "	3,790	1,028	71,9	67	4,9	61,9	894
11	gemischte "	43,200	9,086	948,3	940	8,3	637,2	7500
12	weiße Thromben	2,200	0,503	51,1	48	3,1	40,4	411
13	weiße "	5,500	1,162	134,7	134	0,7	67,1	960
14	weiße "	1,400	0,268	33,8	32	1,8	29,7	204
15	weiße "	0,690	0,147	10,5	7	3,5	21,5	115
16	weiße "	1,420	0,354	49,0	48	1,0	24,7	280
17	weiße "	5,187	1,218	171,5	169	2,5	78,8	968
18	weiße "	5,870	1,246	291,8	291	0,8	91,8	862

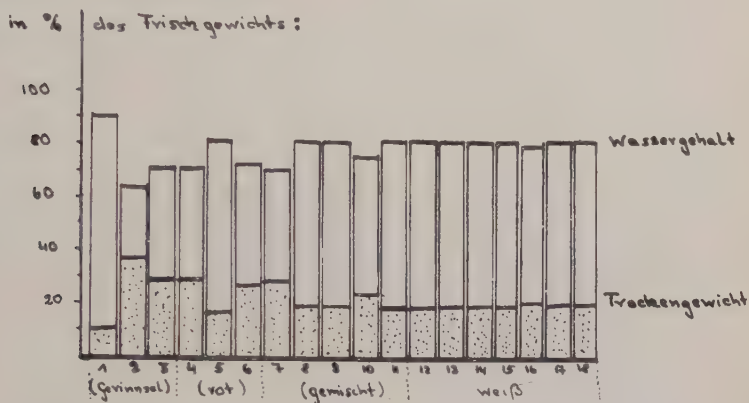
Die folgende Tabelle zeigt die prozentuale Zusammensetzung des Frisch- sowie des Trockengewichts der Thromben. Das Trockengewicht setzt sich aus den Gesamtlipiden, den wasserlöslichen Extraktionsstoffen und den extrahierten Thrombenrückständen zusammen und wird stets durch Addition dieser drei Größen ermittelt. Der Wassergehalt ergibt sich aus der Differenz zwischen Trocken- und Frischgewicht:

Tabelle II:

Nr.	Art der Blutgerinnung	Frischgewicht (g)	Prozent.Anteil am Frischgewicht:			Trockengewicht (g)	Prozent.Anteil am Trockengewicht:		
			Trockengew. %	Wassergehalt %	Ges. lipide %		Ges. lipide %	wasserlös. Extr. %	extr. Rückst. %
1	Speckhaut	11,200	10,31	89,69	0,75	1,155	7,28	17,39	75,3
2	Speckhaut	4,550	37,90	62,10	2,12	1,719	5,62	11,19	83,1
3	Cruor	4,910	29,80	70,20	0,92	1,463	3,09	3,55	93,3
4	rote Thromben	7,720	29,05	70,95	0,72	2,243	2,50	3,42	94,0
5	rote "	1,000	16,90	83,10	0,72	0,169	4,26	10,00	85,7
6	rote "	0,962	29,21	70,79	1,88	0,281	6,47	4,66	88,7
7	gemischte "	13,000	31,58	68,42	0,76	4,105	2,43	3,05	94,5
8	gemischte "	6,260	20,39	79,61	1,38	1,277	6,79	3,83	89,3
9	gemischte "	10,020	22,67	77,33	1,65	2,272	7,28	5,15	87,5
10	gemischte "	3,790	27,12	72,88	1,89	1,028	6,99	6,02	86,9
11	gemischte "	43,200	21,03	78,97	2,19	9,086	10,44	7,01	82,5
12	weiße "	2,200	22,86	77,14	2,32	0,503	10,16	8,03	81,8
13	weiße "	5,300	21,92	78,08	2,54	1,162	11,59	5,77	82,6
14	weiße "	1,400	19,29	80,71	2,41	0,268	12,61	11,07	76,3
15	weiße "	0,690	21,30	78,70	1,52	0,147	7,14	14,62	78,2
16	weiße "	1,420	24,93	75,07	3,45	0,354	13,84	7,16	79,0
17	weiße "	5,187	23,48	76,52	3,30	1,218	14,90	6,46	78,6
18	weiße "	5,870	21,22	78,78	4,97	1,246	23,41	7,36	69,2

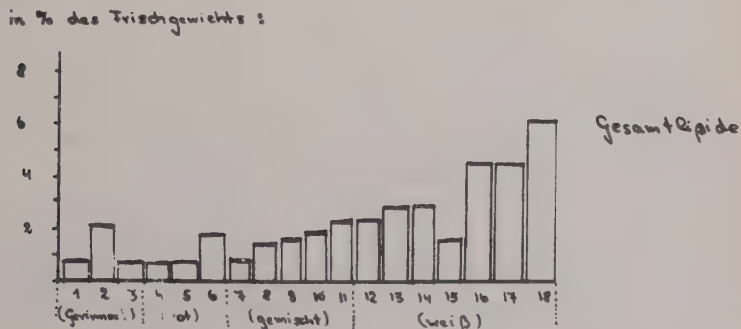
Die die Tabellen ergänzenden graphischen Darstellungen lassen die ermittelten Unterschiede zwischen den einzelnen Erscheinungsformen der Thromben deutlich werden:

Graphische Darstellung I:

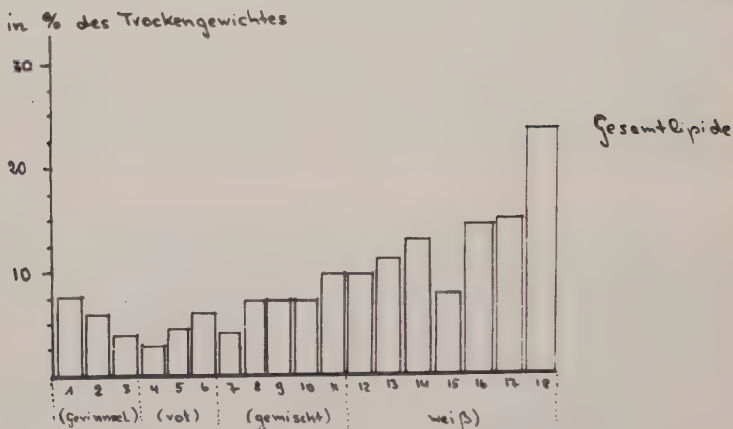


Während der Wassergehalt der weißen Thromben weitgehend konstant ist, zeigen sich bei den übrigen Thromben stärkere Schwankungen, die sich teilweise aus ihrem morphischen Bild erklären, und aus denen man gewisse Rückschlüsse auf ihr Alter ziehen kann: Je älter der Thrombus ist, umso mehr verliert er an Wasser.

Graphische Darstellung II:



Graphische Darstellung III:



Der Gehalt an Gesamtlipiden nimmt zu, je größer der weiße Anteil des Thrombus wird. Diese Lipidzunahme bezieht sich sowohl auf das Frisch- (graphische Darstellung II), als auch auf das Trockengewicht (graphische Darstellung III). Bei Anstieg der Gesamtlipide und gleichzeitigem Absinken des Wertes für extrahierte Rückstände bleibt derjenige für die wasserlöslichen Extraktionsstoffe etwa gleich. Diese Beziehungen gelten besonders für die weißen Thromben, während die roten Thromben und Gerinnssel wenig beurteilbare Ergebnisse brachten.

B. Qualitativer Teil:

Die auffallenden quantitativen Unterschiede unter den Gesamtlipiden zwischen roten und weißen Thromben ziehen die Frage nach sich: Sind an der Erhöhung dieser Mengen nur die Lipide im engeren Sinn, also die Neutralfette und die freien Fettsäuren bei konstant bleibenden Werten des Cholesterins und der Phosphatide beteiligt, oder handelt es sich um eine Vermehrung aller Komponenten? Hier hat die qualitative Analyse einzusetzen. Zur Klärung und ersten Übersicht dieses Fragenkomplexes bietet sich die Papierchromatographie an, die auf Grund ihrer Anwendungsmöglichkeiten gerade bei kleinsten Ausgangsmengen (Bruchteile eines mg) eine brauchbare Methode darstellt.

1) Papierchromatographie

Die Papierchromatographie beruht auf dem Prinzip der Verteilungschromatographie (25,26). Prinzipiell handelt es sich um einen zweiphasigen, kontinuierlichen Verteilungsvorgang, wobei sich stets ein Gleichgewicht der Substanzkonzentrationen einstellt. Wieweit Adsorptionsvorgänge eine Rolle spielen, ist noch nicht endgültig geklärt. Sie sind nach Cramer (26) für den Ablauf der Chromatographie nicht ausschlaggebend. Die Phasen bestehen aus einer mobilen (Steigflüssigkeit) und einer immobilen oder stationären Phase (meistens das mit Wasser befeuchtete Papier), die nur beschränkt miteinander mischbar sein dürfen. Die zu trennenden Substanzen müssen in beiden Phasen etwa gleich gut löslich sein, sonst wandern sie auf dem Papier entweder gar nicht oder mit der Front der mobilen Phase. Um eine Trennung mehrerer Substanzen zu erreichen, müssen sich deren Verteilungskoeffizienten in den verwendeten Lösungsmitteln genügend unterscheiden. Die Wanderungswege der gelösten Substanzen sind deren wichtigste Charakteristika und werden durch den R_F -Wert ausgedrückt:

$$R_F = \frac{\text{Entfernung der Substanz A vom Start}}{\text{Entfernung der Lösungsmittelfront vom Start}}$$

Die R_F -Werte sind kleiner oder gleich 1 und theoretisch unabhängig von der Länge des Papierstreifens. Praktisch hat sich jedoch erwiesen, daß die R_F -Werte etwas mit der Länge der absoluten Laufstrecke schwanken. Man sieht eine Höhe von etwa 30cm als maximal an. Scharfe Trennungen erhält man in der Regel nur mit R_F -Werten, die kleiner als 0.90 sind. Die R_F -Werte sind abhängig von Temperatur, Konzentration des Lösungsmittels und des Substanzgemisches, ferner von Qualität und Faserrichtung des verwendeten Papiers. Die Größe der Flecke läßt auf die Quantität schließen, sie ist proportional dem Logarithmus des Substanzgehaltes (32).

a) Materialien:

Nach Thiele und Wober (102) kommen folgende Materialien zur Verwendung:

- 1) Ein von der Fa. Schleicher & Schüll hergestelltes Kieselgelpapier Nr. 289. Nach Thiele hat dieses wesentlich bessere Trennungseigenschaften als das frühere von Marinetti und Stotz (63) angegebene Papier, welches unter kaum zu standardisierenden Bedingungen mit Kieselgel imprägniert wurde.
- 2) Als Lösungsmittel wird eine der von Armbruster und Beiss (3) entwickelten Steigflüssigkeiten benutzt. Diese setzt sich wie folgt zusammen:
Diisobutylketon, Methylisobutylketon, Methyläthylketon, Chloroform, Ameisensäure (98%ig) und Wasser im Verhältnis 30:26:20:110:30:3.
Die Steigflüssigkeit wird jedesmal frisch angesetzt, da nach Thiele und eigener Erfahrung die Alterung eine Zunahme der R_F -Werte, insbesondere die der cholinhaltigen Phosphatide, und eine schlechtere Trennung der Kepheline bewirkt.
- 3) Die Färbung und die Fixierung erfolgt nach einer Methode von Jatzkewitz und Mehl (46), die sich als Übersichtsfärbung für fast alle Lipide eignet.
Die genannten Autoren verwenden Bromthymolblau in 0,01 n Natronlauge (4:10 V.T.) gelöst. Diese Methode ist recht empfindlich und hat als untere Nachweisgrenze

ze Lipidmengen von 0,1-1 μ g. Die Intensität der Anfärbung erlaubt nur Rückschlüsse auf die Qualität, nicht auf die Quantität.

- 4) Als Ergänzung findet eine von Cramer (74) angegebene Ninhydrinfärbung Verwendung. Dieses Reagenz weist speziell α -Aminogruppen nach, die nach Decarboxylierung der Aminosäure als Ammoniak freigesetzt werden und sich mit einem weiteren Ninhydrinmolekül zu einem Farbstoff umsetzen. Daneben geben aber auch Aminogruppen ohne Carboxylgruppenkonfiguration den Farbumschlag. Man setzt eine 0,2%ige Ninhydrinlösung in 95%igem Butanol und 5%iger 2n Essigsäure an, besprüht das Papier und erhitzt für kurze Zeit auf 100°C oder beläßt es für 24^h in normaler Zimmertemperatur. Da die entstehenden rot-violetten Farbflecke nur begrenzt haltbar sind und bald ihre Konturen verlieren, kann man sie mit einem Kupferreagenz stabil machen. Stattdessen wurde im vorliegenden Falle das Nynhydrin-Chromatogramm nach voller Entwicklung der Flecke photographiert.
- 5) Zusätzlich kann nach Chargaff, Levine und Green (21) das bereits mit Ninhydrin vorgefärbte Papier mit Molybdatophosphorsäure - als Reagenz auf cholinhaltige Phosphatide - weiter behandelt werden. Dabei wird das Papier etwa 20 min in eine 2%ige wäßrige Molybdatophosphorsäurelösung gelegt, anschließend 30-45 min in fließendem Wasser gespült. Die an der Luft vorgetrockneten, aber noch feuchten Papierstreifen werden daraufhin mit einer 0,4%igen Zinn(II)chloridlösung in 3 n HCl besprüht. Die cholinhaltigen Phosphatide zeigen sich blau auf weißem Grund.

b) Ausführung:

Es wird die eindimensionale aufsteigende Methode angewendet.

Auf einem Bogen von 30 x 40 cm² Größe werden auf einer 3 cm vom unteren Rand markierten Startlinie im Abstand von je 2 cm je 0,05 ml der durch Eindampfen angereicherten Chloro-

form-Methanol-Lösungen, (die etwa 1 mg des zu untersuchenden gelösten Lipidgemisches enthalten), mit einer Pipette aufgetropft. Es werden Proben aller 18 Thromben in tabellarischer Reihenfolge aufgetragen, dazu drei Testsubstanzen: Lecithin (Fa. Nattermann), Sphingomyelin (Fettlabor F. Lindlar) und Lysokephalin (Prof. Dr. H. Debuch, Physiol.-chem. Inst. d. Univ. Köln). Beim Auftragen wird darauf geachtet, daß die benetzte Fläche nicht größer als 1 cm im Durchmesser ist; es wird daher aus einem handelsüblichen Föhn Kaltluftstrom aufgeblasen, um das Lösungsmittelgemisch schneller zum Verdunsten zu bringen. Gleich nach dem Auftragen wird das Papier zu einem Zylinder zusammengerollt, oben und unten mit Klammern in der Mitte mittels Einzelknopfnähten aus weißem Nähzwirn so befestigt, daß sich die Papierenden gerade eben nicht berühren (um zusätzliche Kapillareffekte zu vermeiden (74)) und dann in die bereits angegebene, kurz vorher angesetzte Steigflüssigkeit eingestellt. Zur Erzielung guter Trenneffekte und zur Vermeidung chemischer Veränderungen an den Phosphatiden ist für die Dauer der Laufzeit ein von Wasser- und Lösungsmitteldampf gesättigtes Milieu, die Einhaltung einer konstanten Temperatur von 0° C sowie Dunkelheit erforderlich. Als Chromatographiegefäß (Fa. Desaga, Heidelberg) dient ein Glaszylinder mit plangeschliffenem Deckel, auf dessen Boden eine Schale mit der mobilen Phase steht. Zusätzlich enthält der Zylinder eine Schicht Steigflüssigkeit, in die die am Gefäßrand aufgehängten Filtrierpapierstreifen eintauchen. Auf diese Weise herrscht im Gefäßinneren eine ausreichende Dampfsättigung. Nach Thiele soll die Laufzeit bei einer Steighöhe von ca. 32-40 cm etwa 5 Stunden betragen. Wir benötigen bei der angegebenen Steigflüssigkeit 6 1/2 Stunden und erhalten dabei eine Steighöhe von 23 cm. Nach dieser Zeit wird die Frontlinie markiert und das entrollte Papier zum Trocknen in den Abzug gehängt. Erst nach vollständiger Trocknung kann die Färbung mit Bromthymolblau (bzw. Ninhydrin) durchgeführt werden. Das Reagenz wird durch Druck aus einer Stickstoffbombe mit der Spritzflasche aufgesprüht. Das Papier soll dabei nur so feucht werden, daß es seitlich

gesehen glänzt, jedoch nicht tropft (67). Es zeigt sich sofort der von Jatzkewitz beschriebene Effekt: Lipide erscheinen ockergelb (Monoglyceride und Polyensäuren blaßgelb mit weißem Rand) auf blauem Grund, welcher nach etwa 1/2 Stunde zu schwach gelb verblaßt, wobei die Lipide jedoch sichtbar bleiben. Es wird daher sofort nach dem Aufsprühen photographiert, um die vollen Kontraste festzuhalten.

Das Besprühen mit dem Ninhydrinreagenz erfolgt in gleicher Weise. Die typischen rotvioletten Flecke der primären Aminogruppen bezeichnen die Lage der Kephaline, die bei der Bromthymolblaufärbung nur wie alle anderen Lipide dargestellt werden.

Schließlich wird ein zweites mit Ninhydrin vorgefärbtes Chromatogramm mit Molybdatophosphorsäure nachbehandelt, nachdem die ninhydrinpositiven Flecke noch vor dem Photographieren mit Bleistift umrandet worden sind. Deutlich heben sich nun die cholinhaltigen Phosphatide, also die Lecithine und Sphingomyeline, von den übrigen Substanzen ab.

c) Vergleichschromatogramme

c₁) Qualitative Untersuchung von gesundem Blut:

Um die Lipide der Thromben mit denen des Blutes vergleichen zu können, werden die Lipidextrakte aus Blutplasma und Blutkörperchen eines gesunden Erwachsenen papierchromatographisch analysiert.

Während der Blutentnahme bestand keine alimentäre Lipämie. Die Extraktion erfolgt nach den Angaben von Schöll (91): 10 ml mit Natriumcitrat ungerinnbar gemachtes Blut werden sofort nach der Entnahme mit niedriger Tourenzahl 20 min lang zentrifugiert. Das abgetrennte Plasma wird in einem Erlenmeyerkolben mit dem 10fachen seines Volumens an Methanol versetzt, dann wird das gleiche Volumen Chloroform zugegeben. Unter Schütteln wird das Gemisch im heißen Wasserbad zweimal zum Sieden gebracht, über eine Glasfrittennutsche heiß abgesaugt und mit heißem Chloroform-Methanol (1:1) nachgespült. Das Filtrat wird in einem Erlenmeyerkol-

ben bis zum Rande mit dest. Wasser aufgefüllt und in einen 1000ml fassenden Becher eingestellt, der seinerseits mit dest. Wasser vollgefüllt wird. In den folgenden Stunden (über Nacht) nimmt die untere Chloroform-Methanolphase zugunsten der oberen wäßrigen Phase ab, die sich mit dem Großteil des Methanols und den wasserlöslichen Stoffen des Extraktionsgemisches anreichert. Die verbliebene Unterphase mit den Lipiden wird eingedampft, gewogen und in wenigen ml Chloroform aufgenommen. Die wasserlöslichen Stoffe werden nicht weiter untersucht, da hier nur die Phosphatidzusammensetzung im Chromatogramm interessiert.

Nachdem die sedimentierten Blutkörperchen zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und jeweils anschließend zentrifugiert worden sind, erfolgt die Lipidextraktion nach Folch in gleicher Weise wie die der Thromben. Die gewonnenen Lipidsubstanzen werden wie die anderen nach dem Eindampfen gewogen und wieder in Chloroform gelöst.

Auf dem Papierchromatogramm (Photo IV) werden beide Proben der größeren Genauigkeit halber, zweimal aufgetragen. Zum Vergleich werden die Lipide eines roten und eines weißen Thrombus aus der Chloroform-Methanolextraktion mitchromatographiert. Die Färbung erfolgt mit Bromthymolblau.

c₂) Qualitative Untersuchung des Äther-Aethanolextraktes

Bei der bereits beschriebenen quantitativen Auswertung einer zusätzlichen Äther-Aethanol-Extraktion in Anschluß an die Chloroform-Methanol-Extraktion ergaben sich außerordentlich geringe Lipidmengen, die den praktischen Wert der Methode zweifelhaft erscheinen ließen. In einem zusätzlichen Chromatogramm soll die qualitative Zusammensetzung der durch Äther-Aethanol extrahierten Lipide im Vergleich zu den mit Chloroform-Methanol extrahierten Lipiden geprüft werden. (Photo V)

Nebeneinander werden je zwei in Chloroform gelöste Lipidproben des gleichen Thrombus aufgetragen. Die Proben entstammen der Äther-Aethanolextraktion bzw. der Chloroform-Methanolextraktion. Unter den Thrombenlipidproben wird je

ein Vertreter der Speckhautgerinnsel (Nr.2), der roten (Nr.6), der gemischten (Nr. 10) und je zwei Vertreter der weißen Thromben (Nr. 14 und 15) ausgesucht. Die Färbung erfolgt mit Bromthymolblau.

c₃) Papierchromatogramm mit Zusatzversuchen

Zur sicheren Identifizierung der Lipidkomponenten wird ein Zusatzchromatogramm angefertigt, das aus Platzgründen nicht zur Abbildung kommt.

Das zu untersuchende Lipidgemisch wird mehrmals nebeneinander aufgetragen und pro Auftrag ein jeweils verschiedenes bekanntes Lipid zugesetzt. Die Verstärkung des jeweiligen Flecks ohne Verschiebung seiner Grenzen spricht für seine Identität mit dem bekannten Lipid. Als Lipidtestsubstanzen standen zur Verfügung: "Neutralfett (gewonnen aus menschlichem, gelben Knochenmark), freie Fettsäuren und Sphingomyelin (alle drei aus dem Fettlabor F. Lindlar), ferner Colamin-Kephalin und Lysokephalin (Prof.Dr.H. Debuch, Köln), Lecithin (Fa. Nattermann) und Cholesterin (Fa. Merck).

Neben dem chromatographischen Zusatzversuch ist die Kenntnis der R_F -Werte als den Quotienten aus der Entfernung vom Start zum Fleckmittelpunkt und vom Start zur Lösungsmittelfront, unerlässlich. Die ermittelten Werte lauten wie folgt:

(1') Oligopeptide, Triglyceride,	R_F :
Aminosäuren (Colamin)	0,00 - 0,04
(2') Phosphoinositide	0,22
(3') Lysoverbindungen (hpts. Lyso-	
lecithin und Lysokephalin)	0,28
(4') Sphingomyelin	0,36
(5') Lecithin	0,50
(6') Colamin-Kephalin	0,53
(7') Cholesterin (Acetate, Stearate)	0,90 - 0,94
(8') Fettsäuren und Fettaldehyde	1,00

Die ermittelten R_F -Werte stimmen gut mit den von Thiele (77) angegebenen Mittelwerten überein.

Die Lage unserer vermuteten Phosphoinositidkomponente ent-

spricht der von bekanntem Monophosphoinositid*. Über Diphosphoinositide läßt sich zur Zeit noch nichts Sicheres sagen. Lindlar (60) trennte auf papierchromatographischem Wege Lipidextrakte autolytisch veränderter Organe, Gehirnlipide und Sojalecithin und konnte ebenfalls Phosphoinositid (mit gleichem R_F -Wert) von den übrigen Phosphatiden sicher abgrenzen.

Das verwendete Lösungsmittel eignet sich besonders gut für die zuverlässige Trennung der Phosphatide. Während Verunreinigungen wie Oligopeptide und freie Aminosäuren, die trotz des Ausschüttelns der Lipidextrakte mit Wasser noch in Spuren vorhanden sein können, nahe der Startlinie bleiben, die freien Fettsäuren, Fettaldehyde und Cholesterin mit seinen Estern dagegen praktisch mit der Lösungsmittelfront wandern, bleibt das Mittelfeld frei zur Trennung und Darstellung der Phosphatide. Diese Tatsache erleichtert ihre Beurteilung.

c₄) Ergebnisse und Bewertung der Haupt- und Vergleichs-chromatogramme

Das papierchromatographische Bild der Phosphatide ist bei allen Thromben auffallend gleichartig (Photo I, II, III): Nach Größe und Farbintensität der abgebildeten Flecke sind Lecithin (5') und Sphingomyelin (4') die Hauptkomponenten, sie dürften den Großteil der Phosphatidfraktion darstellen. Die Lysoverbindungen (3') bestehen hauptsächlich aus ninhydrinpositiven Lysokephalinen und molybdatophosphorsäurepositiven Lysolecithinen. Wahrscheinlich überwiegt der Lysolecithinanteil. Zöllner (110) fand bei der säulenchromatographischen Trennung von plasmatischen Lysoverbindungen den vierfachen Anteil des Lysolecithins gegenüber den Lysokephalinen.

Auffallend ist der relativ starke ninhydrinpositive Anteil der Lecithin- und Sphingomyelinfraktion (Photo II). Hier dürfte es sich um Plasmalogenbeimengungen handeln, deren

* Von der Fa. Nattermann & Cie. Köln in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt.

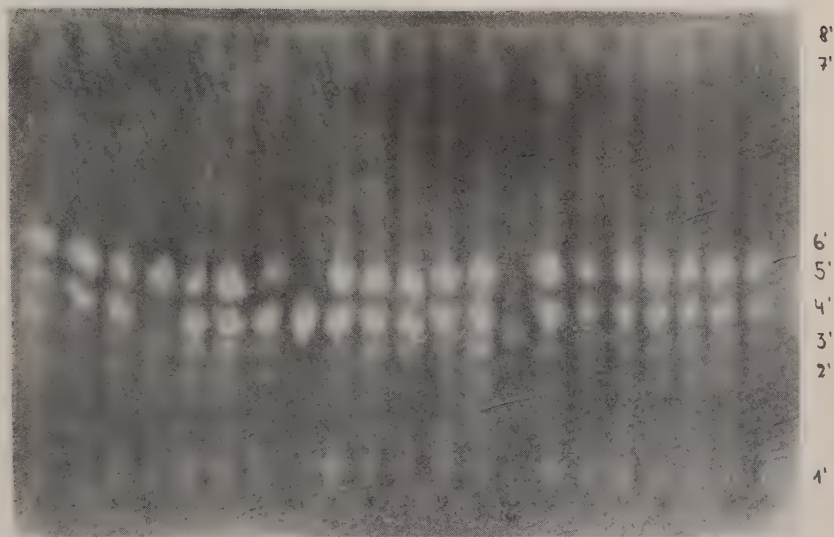


Photo I: Papierchromatographische Trennung der mit Chloroform-Methanol extrahierten Thrombenlipide.

1-3 = Cruorgerinnsel;

4-6 = rote Thromben;

7-11= gemischte Thromben;

12-18= weisse Thromben.

Dazu die Testsubstanzen Lecithin (Nattermann), Sphingomyelin und Lysokephalin. Bromthymolblaufärbung.

1' = Oligopeptide, Triglyceride, Aminosäuren

2' = Phosphoinositide

3' = Lysoverbindungen (hpts. Lysolecithin und Lysokephalin)

4' = Sphingomyelin

5' = Lecithin

6' = Colamin-Kephalin

7' = Cholesterin- und Ester

8' = Fettsäuren und Fettaldehyde

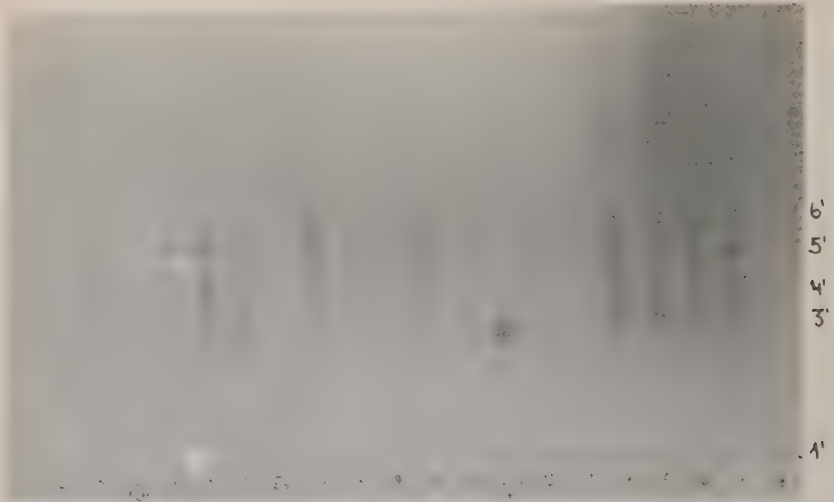


Photo II: Papierchromatographische Trennung der mit Chloroform-Methanol extrahierten Thrombolipide. Ninhydrinfärbung.

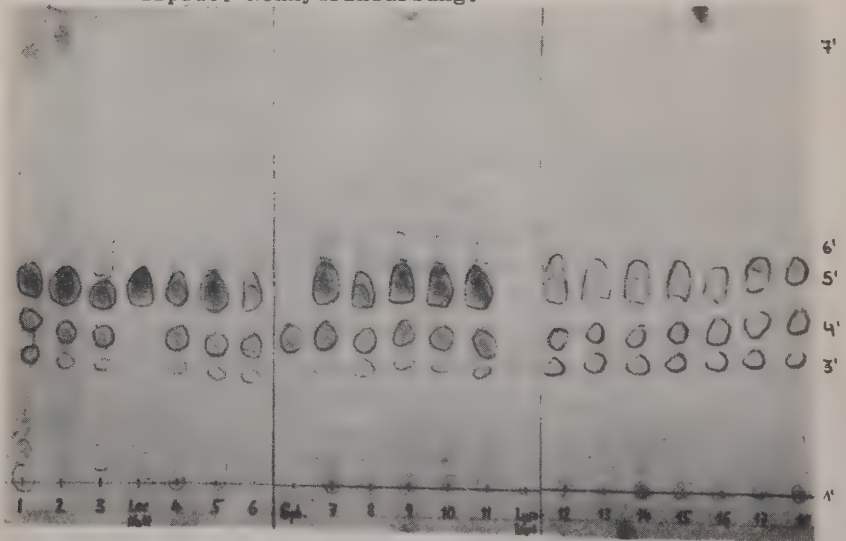


Photo III: Papierchromatographische Trennung der mit Chloroform-Methanol extrahierten Thrombolipide. Mit Ninhydrin vorgefärbt und Molybdätsäure nachgefärbt. (Mit Bleistift umrandet).
Erläuterungen siehe Seite 45.

serin- und colaminhaltige Anteile die Farbreaktion primärer Aminogruppen ergeben. Wahrscheinlich enthalten einzelne Phosphatidflecke im Chromatogramm II ebenfalls Plasmalogen. Ob und inwieweit Cholin-Plasmalogen in den Thrombenlipiden vorhanden ist, läßt sich nicht sagen.

Die Verunreinigung der Lipidextrakte mit freien Aminosäuren ist sicher unerheblich, da, wie bereits beschrieben, alle Extrakte mit Wasser ausgeschüttelt worden sind. Zöllner (110) konnte nach der Chloroform-Methanol-Extraktion säulenchromatographisch nur in der Kephalinfraktion freie Aminosäuren nachweisen. Trennte er jedoch die mit der Äther-Aethanol-Extraktionsmethode gewonnenen Phospholipide weiter auf, so fand er in allen Phosphatidfraktionen reichlich ninhydrinpositive Substanzen. Durch Ausschütteln mit einer 0,02%igen Calciumchloridlösung nach vorhergehender Lösung in Chloroform konnte er diese Substanzen abtrennen und als nicht covalent gebundene Verunreinigungen charakterisieren.

Wieweit die aufgetragenen Phosphatide ihrerseits während der papierchromatographischen Trennung beeinflußt werden, ist noch nicht geklärt. Auffallend ist jedoch das Verhalten des reinen Lecithins als Testsubstanz (Photo I). An typischer Stelle findet sich unter dem eigentlichen Lecithinflecken ein weiterer Fleck, der mit Lysolecithin identisch sein muß (76). Das Testlecithin erfährt bei längerem Lagern eine hydrolytische Spaltung. Nach Zöllner (110) kann die Spaltung während der Chromatographie selbst nicht erheblich sein, da er nach einer Rechromatographie eines Kephalin-Lecithin-Sphingomyelingemisches keine Lysoverbindungen finden konnte.

Ebenso wie zusätzliche Lysoverbindungen durch Abspaltung des ersten Fettsäuremoleküls aus Esterphosphatiden gebildet werden können, ist auch eine Neubildung durch Spaltung der Aldehydbindungen der Plasmalogene denkbar. Die Bindung des Aldehyds an das Phosphatid ist recht labil und schon bei milder Säureeinwirkung spaltbar (Debuch, zit. bei Pezold (75)).

Der Eindruck eines gleichmäßigen Phosphatidbildes ändert sich, wenn man die mit Bromthymolblau gefärbte Übersicht mit der Ninhydrinfärbung des Photos II vergleicht. Es fällt auf, daß die Speckhautgerinnsel nahezu frei von Kephalingen (bes. Colaminkephalinen) sind, sowie von den übrigen ninhydrinpositiven Substanzen, die wir als Plasmalogene ansprechen. Nur schwach dargestellt sind sie auch bei einigen der untersuchten Thromben. Häufig lassen sich schwache Darstellungen mit einer zu geringen Auftragsmenge erklären. Dies trifft für die Thromben 8,9,11 zu, deren Phosphatide auf Photo II schlecht, auf Photo III relativ gut dargestellt werden. Die Bewertung dieser Befunde soll jedoch in einer abschließenden Stellungnahme erfolgen.

Was die Trennung der Phosphoinositidkomponente von den übrigen anbelangt, so scheint diese frei von ninhydrinpositiven Beimengungen zu sein, wie sich aus ihrer Nichtanfärbbarkeit im Chromatogramm II und III schließen läßt.

Ergebnisse der Vergleichschromatogramme:

1) Das Vergleichschromatogramm IV mit den Thrombenlipiden und den Lipiden aus Serum und Blutkörperchen eines Erwachsenen weist die gleichen Verhältnisse auf, wie sie eben beschrieben wurden.

Erwähnenswert ist die Schwanzbildung während der Trennung der Blutkörperchenlipide (besonders bei 8 und 10). Zu diskutieren sind starke Plasmalogenbeimengungen oder die vermehrte Anwesenheit von lipoidlöslichen Pigmenten, die vom Lösungsmittel teilweise mitgeschleppt wurden.

2) Das Vergleichschromatogramm V zeigt die erwarteten Ergebnisse: Der Gehalt an Phosphatiden im Äther-Aethanol-Extrakt ist in unseren Proben so gering, daß diese sich bei den aufgetragenen Mengen nicht mehr nachweisen lassen. Eine Ausnahme macht das Speckhautgerinnsel Nr. 2, dessen Auftragsmenge offenbar etwas größer war und somit die Darstellung möglich machte. Die qualitativen Anteile der Phosphatidkomponenten sind denen der übrigen Proben etwa gleich,

Photo IV: Papierchromatograph.
Trennung der mit Chloroform-
Methanol extrahierten Throm-
benlipide und Serum-Blutkör-
perchenlipide. Bromthymol-
blaufärbung. (5= Lecithin,
Nattermann) 6= roter Thrombus
(5) 7= weißer Thrombus (12);
8= Blutkörperchen; 9= Serum;
10= Blutkörperchen; 11=
Serum;)

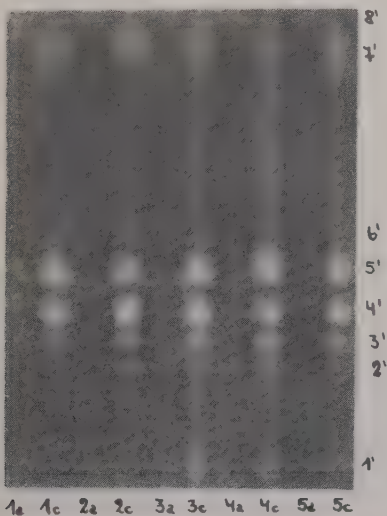
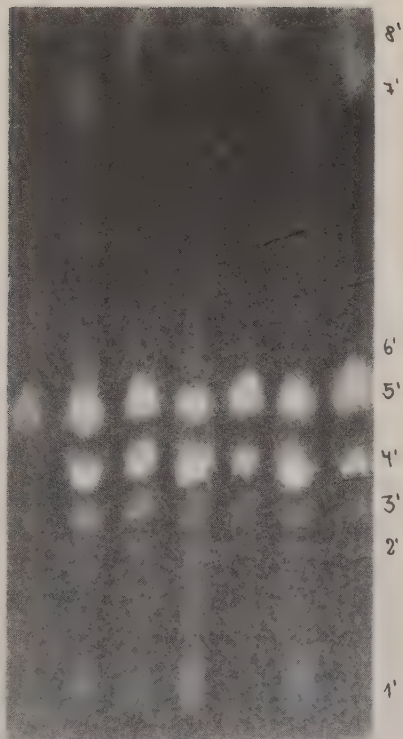


Photo V: Papierchromato-
graphische Trennung der
durch Ather-Aethanol (a)
und Chloroform-Methanol (c)
extrahierten Thromben-
lipide. Bromthymolblau-
färbung. 1= Speckhautge-
rinnsel Nr. 2; 2= roter
Thrombus Nr. 6; 3= gemisch-
ter Thrombus Nr. 10;
4= weißer Thrombus Nr. 14;
5= weißer Thrombus Nr. 15;

die quantitativen entsprechen jedoch nur einem Bruchteil denen der Chloroform- Methanol-Extraktion. Dies bestätigt die Annahme, daß bei der Äther-Aethanol-Extraktion im Anschluß an die Chloroform-Methanol-Extraktion nur noch kleine Lipidreste gewonnen werden, deren Zusammensetzung derjenigen der Hauptextraktion entspricht und die daher vernachlässigt werden können.

2) Säulenchromatographie

Die Säulenchromatographie wird dann angewandt, wenn es um die Trennung größerer Substanzmengen geht. Es sollen die Phosphatide von den übrigen Lipiden abgetrennt und ihre absoluten wie prozentualen Gewichtsanteile (bezogen auf die Gesamtlipide) ermittelt werden.

Die Chromatographie in Säulen, die gleich der Papierchromatographie infolge unterschiedlicher Verteilungsvorgänge und wahrscheinlich auch durch Adsorptionsvorgänge zur Trennung von Substanzen führt, ist von Martin und Synge (65) entwickelt worden. Sie hat als mobile Phase das Lösungsmittel, als immobile (stationäre) Phase den in eine Säule gefüllten und mit Wasser, bzw. einem Lösungsmittel befeuchteten Trägerstoff. Das zu trennende Substanzgemisch wird in die Säule auf den Trägerstoff aufpipettiert und von dem nachfließenden Lösungsmittel in den Trägerstoff eingewaschen. Die Stoffe, die vom Lösungsmittel sofort gelöst werden, durchlaufen die Säule relativ schnell und reichern sich in der unteren Zone an. Die übrigen Stoffe werden von ihnen getrennt, da sie in der oberen Zone zurückgelassen werden. Die untere Zone wird schließlich im Überschuß des Lösungsmittels aus der Säule herausgewaschen und aufgefangen. Die in der Säule verbliebenen Stoffe werden anschließend mit einem für sie geeigneten Lösungsmittel eluiert.

Ausführung und Identifizierung:

Als Säulenrohr wird ein unten verjüngtes und mit einem Hahn verschließbares Glasrohr verwendet, dessen Höhe und Durchmesser in gewissen Grenzen für den Erfolg der Chroma-

tographie entscheidend sind und sich nach der jeweiligen Substanzmenge und dem Füllmaterial richten. Die verengten Stelle wird mit Watte verstopft, um den Trägerstoff zurückzuhalten.

Als Trägerstoff dient Kieselgel, das von Borgström (11) als beste Substanz zur Trennung von Phosphatiden und Neutralfett mit freien Fettsäuren angesehen wird. Pulverisierte Kieselsäure p.a. wird mit Hyflo Super Gel im Verhältnis 2:1 sorgfältig vermischt und bei 120°C 24 Stunden lang aktiviert. Nach Borgström verbessert Hyflo Super Gel den Durchlauf. Das Gemisch wird in dunklen Flaschen aufbewahrt und möglichst vor Sauerstoffzutritt geschützt.

Nach den Angaben Borgströms können 1 g Kieselgelgemisch für je 30 mg zu trennendes Lipidgemisch als ausreichend angesehen werden. Eine zu große Säule würde größere Elutionsvolumina und damit Zeitverlust bedeuten. Es ist daher notwendig, die Ausgangslipidmengen zu kennen. Als mobile Phase werden wasserfreie, frisch destillierte Lösungsmittel verwendet.

Die erforderliche Menge Kieselgelgemisch wird mit Chloroform aufgeschlämmt und in die Säule gefüllt. Nachdem sich die Aufschlammung abgesetzt hat, läßt man die überstehende Menge Chloroform ablaufen. Das Gemisch darf weder zu fest noch zu lose in der Säule sitzen, da sich dies entscheidend auf die Durchlaufgeschwindigkeit des nachfließenden Lösungsmittels auswirkt. Je kleiner die Durchlaufvolumina pro Zeiteinheit sind, desto scharfer ist die Trennung. Es wird eine Tropfenzahl von höchstens 10-12/min angestrebt, die auf Chloroform bezogen etwa einem Volumen von 0,2 ml entspricht.

Sowie das überstehende Chloroform abgelaufen ist, müssen die in wenigen ml Chloroform gelösten Lipide einpipettiert werden, da ein Trockenwerden der Säule unter allen Umständen vermieden werden muß, um einer Änderung der Säulenstruktur entgegenzuwirken. Die Oberfläche des Trägerstoffes darf nicht aufgewirbelt werden, was durch Auflage eines Filterblättchens verhindert wird (67). Wenn die Lipide in die oberste Schicht des Trägerstoffes eingezogen sind, wird

das Lösungsmittel vorsichtig nachgefüllt. Nach Borgström werden für die einfache Trennung der Phosphatide von den übrigen Lipiden pro mg zu eluierendes Fett etwa 2 ml Lösungsmittel benötigt.

Zunächst wird die Eluierung der nichtphosphorhaltigen Fette mittels Chloroform durchgeführt, dann erfolgt die der Phosphatide durch Methanol. Dabei verzichtet man gezwungenermaßen auf eine sorgfältige Trennung der verschiedenen Lösungsmittel und läßt das Elutionsmittel auf das vorangegangene folgen. Die beiden eluierten Fraktionen werden getrennt in Meßzylindern aufgefangen.

In Form von sogenannten Tüpfelproben verschafft man sich einen Überblick über das Funktionieren der Säule. In etwa einstündigen Abständen werden einige Tropfen des Durchlaufes auf einem Filterpapier aufgefangen und mit Bromthylmolbau angefärbt. Die Färbemethode ist so empfindlich, daß sich schon Spuren von Lipiden in der Größenordnung von μ darstellen lassen. Eine andere Methode, die bei verschiedenen Säulenchromatogrammen angewendet wurde, besteht darin, Durchlauflüssigkeit auf einen Spiegel oder eine einfache Glasplatte tropfen zu lassen und nach dem Trocknen zu prüfen, ob ein Fettfleck oder auch Cholesterinkristalle zurückbleiben. Diese Methode ist ebenfalls sehr empfindlich.

Es zeigt sich, daß die eluierten Lipidmengen der ersten Fraktion langsam anwachsen, ihr Maximum zu Beginn der zweiten Stunde erreichen und dann langsam abnehmen, um nach Ablauf der 5. Stunde nicht mehr nachweisbar zu sein. Der Verlauf der Elution ist von der Menge der zu eluierender Lipide, von der Zeit sowie von der Art des Lösungsmittels abhängig, jedoch nur begrenzt von der Menge des Lösungsmittels. Es muß natürlich ein bestimmtes Mindestvolumen durchlaufen, um ein Verbleiben restlicher Lipide auf der Säule zu vermeiden.

Es werden die in Chloroform gelösten Lipidextrakte der Thromben 3 und 4 (rote), 9 und 11 (gemischte), 17 und 18 (weiße) säulenchromatographisch getrennt. Die noch lösungsmittel-

freien Proben wurden vorher gewogen. Die Lipidextrakte der beiden roten Thromben 3 und 4 werden vereinigt, da ihre Mengen jede für sich zu gering sind.

Der Chloroform-Durchlauf und das Methanol-Eluat werden getrennt aufgefangen, zur Trockne eingedampft und gewogen. Die Lipidfraktionen werden in 1-2 ml Chloroform aufgenommen, in Ampullen unter CO₂ eingeschmolzen und bis zur weiteren Analyse im Dunkeln bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Kälte wird vermieden, um Lipidausfällungen zu unterbinden.

Ergebnisse der säulenchromatographischen Trennung:

In der folgenden Tabelle sind die Ausgangsgewichte den Gewichten der getrennten Lipidfraktionen gegenübergestellt:

Tabelle III

lfd. Nr. des Ausg. mat.	Ausgangs- gewicht (mg)	Lipide d.Chlo- roform- frakt. (mg)	Lipide d.Me- thanol- frakt. (mg)	Summe d. beiden Fraktionen (Endgew.) (mg)	verlorene Substanz (mg)
3+ 4	47,0	17,7	28,0	45,7	1,3
9	109,0	48,0	60,0	108,0	1,0
11	190,0	103,5	86,0	189,5	0,5
17	78,8	27,5	50,0	77,5	1,3
18	45,0	16,0	29,0	45,0	0,0

Das Endgewicht setzt sich aus dem Anteil der Chloroform- und dem der Methanolfraction zusammen. Die Differenz bezeichnet die Lipidmenge, die auf der Säule geblieben ist. Sie beträgt wenige mg, die in Prozenten ausgedrückt, zwischen 0 und 2,8% schwankt. Diese Verluste sind minimal und können vernachlässigt werden. Es ist mit einiger Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß es sich hierbei weniger um Verunreinigungen handelt, die vom Trägerstoff zurückgehalten worden sind. Fragen über den Phosphatidgehalt beider Fraktionen werden im nächsten Abschnitt behandelt. Es darf eine weitgehende Trennung der phosphorhaltigen von den phosphorfreen Lipiden vermutet werden. Der Vorteil auch bei unvollständiger Tren-

nung besteht darin, daß sich mit der phosphatidreichen Fraktion eine relativ genauere Phosphorbestimmung durchführen läßt als etwa mit den Gesamtlipidextrakten, weil die Gegenwart phosphorfreier Lipide im Gemisch die vollständige Veraschung der phosphorhaltigen Lipide behindert (Klenk 50).

3. Phosphatidbestimmung

Die Phosphatidbestimmung erfolgt auf colorimetrischem Wege nach den Angaben von Fiske und Subbarow (33) modifiziert nach Krainick (54).

Die in Ampullen aufbewahrten und in Chloroform gelösten Lipide, die säulenchromatographisch in eine phosphorreiche und in eine phosphorarme Fraktion getrennt worden sind, werden mit Chloroform auf ein genaues Volumen von 10 ml gebracht. Es wird ein aliquoter Teil mit etwa 0,5 mg Lipidsubstanz entnommen, in 50 ml fassende Veraschungskolben eingebracht und verdampft. Die Veraschung der Phosphatide erfolgt bei 300°C unter Zugabe von 0,3 ml konzentrierter Schwefelsäure p.a.. Dabei entsteht aus dem Lipoidphosphor Orthophosphorsäure. Diese bildet mit Ammoniummolybdat die komplexe Phosphormolybdänsäure, die durch 1,2,4,-Aminonaphtholsulfonsäure zu Molybdänblau reduziert wird. Die Farbintensität des Molybdänblaus ist der Phosphormenge direkt proportional und wird colorimetrisch bestimmt. Die Messung erfolgt im Eppendorf-Photometer, Photozelle "906", Filter "Hg 578", Schichtdicke $d=1$ cm. Die Extinktionen werden gegen einen Leerwert abgelesen, die entsprechenden Phosphorwerte aus einer Eichkurve ermittelt. Diese wird bei jeder Messung mit Hilfe einer bekannten Phosphatlösung überprüft.

Die erhaltenen Werte stellen den absoluten Phosphorgehalt der untersuchten Probe dar. Durch Multiplikation dieses Wertes mit 25 ergibt sich der absolute Phosphatidgehalt, da der mittlere Phosphorgehalt der gesamten Phosphatide rund $1/25$ ihres Gewichtes ausmacht.

Neben der Phosphorbestimmung der säulenchromatographisch getrennten Fraktionen werden die papierchromatographisch aufgetrennten Phosphatidkomponenten auf ihren Phosphorgehalt untersucht. Nach Marinetti (64) werden die Lipidflecke des Papierchromatogramms I unter sorgfältiger Einhaltung ihrer Begrenzungen mit der Schere ausgeschnitten und in einwandfrei gesäuberte Reagenzgläser gebracht. Dazu werden einige Papierproben als Leerwerte mitbestimmt, die die Größe der übrigen Papierschnitte haben, jedoch frei von lipidhaltigen Stoffen sind. Die Blättchen werden dreimal mit je 5 ml einer etwa 1 n methanolischen Salzsäure (1 Teil 36%ige HCl p.a. auf 9 Teile dest. Methanol) ausgekocht und heiß durch eine Glasfrittennutsche filtriert. Mit 5 ml reinem Methanol wird unter kurzem Erhitzen nachgewaschen, um verbliebene Phosphatidreste zu lösen und gleichzeitig die Nutsche nachzuspülen. Der filtrierte Extrakt wird in einen Veraschungskolben aufgefangen, im Wasserbad zur Trockne eingedampft, und die Phosphorbestimmung angeschlossen.

Die Berechnung der Phosphatide erfolgt - im Gegensatz zu vorher - unter Berücksichtigung des Phosphorgehaltes des jeweiligen Phosphatids mit Ausnahme des Phosphoinositids. Hier wird mit dem Mittelwert 25 gerechnet, da zur Zeit die genaue Struktur des Phosphoinositids noch nicht bekannt ist (75), und es sich wahrscheinlich um mehrere chemisch verwandte Substanzen handelt. Die Umrechnungsfaktoren werden einer einschlägigen Tabelle entnommen.

	mittleres Molekulargewicht:	Faktor:
Lysolecithin und Lysocolaminkephalin (1:1)	515	17
Lecithin	810	27
Sphingomyelin	778	26
Colamin-Kephalin	768	25
Phosphoinositid (Mittelwert)	768	25

Ergebnisse:

Bei der Bewertung der ermittelten Phosphatidmengen muß

an Verunreinigungen des Extraktes gedacht werden, die die colorimetrische Messung stören können. So beeinflussen nach Rae und Fastcott (82) Harnstoff und Natriumchlorid die Farbentwicklung ungünstig. Beide Stoffe wurden von Folch, Van Slyke (35) sowie Christensen (24) in Lipidextrakten nachgewiesen. Ferner ergeben sich falsche Werte, wenn der Extrakt Nichtphosphatidphosphor enthält. Nach Artom (4) schwanken diese Verunreinigungen zwischen 1,4 bis 10,7% des Gesamtphosphatidphosphors.

Bei der Phosphorbestimmung der papierchromatographisch getrennten Substanzen sind diese Erwägungen insofern weniger wichtig, als die gefundenen Phosphatidmengen nur der Bestimmung der Relationen der Phosphatidkomponenten dienen. Dabei würden alle Komponenten gleichmäßig von eventuellen Störungen betroffen sein. Im übrigen arbeiteten die erwähnten Autoren ausschließlich mit der Bloor'schen Äther-Aethanol-Extraktionsmethode, wir haben aber schon an anderer Stelle auf die Mängel dieser Methode hingewiesen. Die nach der Vorschrift von Folch hergestellten und mit Wasser ausgeschüttelten Extrakte enthalten - wie erwähnt - weniger Verunreinigungen, die die Phosphorbestimmung stören können. Zunächst werden die Ergebnisse der säulenchromatographischen Trennung besprochen:

Tabelle IV:

Ifd.Nr.	Art des Thrombus	Chloroform-Extraktion:			Methanolextraktion:		
		Lipide	Phosphatide	Nicht-phosphatide	Lipide	Phosphatide	Nicht-phosphatide
		(mg)	%	%	(mg)	%	%
3 + 4	rot	17,7	22,5	77,5	28,0	90,6	9,4
9	gemischt	48,0	43,6	56,4	63,0	104,2	-
11	gemischt	103,5	4,7	95,3	86,0	88,5	11,5
17	weiß	17,5	14,8	85,2	50,0	82,7	17,3
18	weiß	16,0	14,7	85,3	29,0	86,2	13,8

Mittelwert:

24,1
± 19,4

93,5
± 10,7

Die Chloroformfraktion, die phosphorarm sein sollte, enthält mit $24,1 \pm 19,4$ % (bezogen auf die Lipide dieser Fraktion) noch reichlich Phosphatide. Der Prozentsatz der in der Methanolfraction gewonnenen Phosphatide beträgt $93,5 \pm 10,7$ % (bezogen auf die Lipide dieser Fraktion) und stimmt damit annähernd mit den Befunden von Borgström (11), Zöllner (110) und Veerkamp, Mulder, van Deenen (103) überein. Obwohl die Methanolfraction eine durchaus beachtliche Anreicherung an Phosphatiden gegenüber der Chloroformfraktion zeigt, kann der Trenneffekt der Säule nicht als optimal angesehen werden.

In der folgenden Tabelle V werden die erhaltenen Phosphatidwerte auf die Gesamtlipide bezogen. Der absolute Phosphatidgehalt (und Nichtphosphatidgehalt) ergibt sich aus der Addition beider Fraktionswerte.

Tabelle V:

lfd.Nr.	Art des Thrombus	Gesamtlipide (mg)	Gesamtphosphatide (mg)	Gesamtnichtphosphatide (mg)	Anteil an Gesamtlipiden:	
					Phosphatide %	Nichtphosphatide %
3 + 4	rot	101,4	57,7	43,7	56,9	43,1
9	gemischt	165,4	121,1	44,3	73,2	26,2
11	gemischt	948,3	468,5	479,8	49,4	50,6
17	weiß	171,5	75,3	96,2	43,9	56,1
18	weiß	291,8	147,1	144,7	50,4	49,6

Mittelwert:	58,5	41,5
	$\pm 14,6$	$\pm 14,6$

Rund die Hälfte aller Thrombenlipide besteht also aus Phosphatiden. Auffallend ist der hohe Phosphatidgehalt des gemischten Thrombus Nr. 9, der mit 73,2% die anderen bei weitem übertrifft. Mögliche Ursachen werden im Teil III besprochen.

Die Phosphatidrelationen der papierchromatographisch getrennten Gemische kommen in Tabelle VI zum Ausdruck. Zum Vergleich mit Normalwerten werden die relativen Phosphatid-

werte der auf das Chromatogramm V aufgetragenen Blutkörperchen- und Serumlipide eines Erwachsenen herangezogen. Hier ergeben sich jeweils zwei Werte, da alle Proben zweimal nebeneinander aufgetragen wurden:

Tabelle VI

lfd. Nr.	Art des Blutge- rinn- sels bzw. Ver- gleichs- mat.	Gesamt- phospha- tide	Anteil an den Gesamtphosphatiden:				
			Colamin Kepha- lin	Lecithin	Sphin- gomye- lin	Lyso- Ver- bin- dungen	Phos- phoino- sitide
			(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
2	Speckhaut	269	3,7	60,2	24,2	2,6	9,3
3	Cruor	243	10,2	40,0	25,7	14,7	9,2
4	rote Thromb.	190	11,8	45,6	34,2	4,5	3,9
5	" "	466	11,3	53,3	24,5	3,3	7,5
6	" "	265	13,2	42,8	39,2	1,9	2,8
7	gemischte "	438	14,3	46,2	29,1	4,7	5,7
9	" "	218	10,3	40,9	41,8	7,0	-
11	" "	263	4,8	50,3	37,6	4,5	2,9
12	weiße "	242	15,4	42,4	27,9	11,2	3,1
14	" "	396	13,3	43,0	27,6	7,3	8,8
15	" "	260	11,5	37,4	36,0	6,5	8,7
16	" "	294	10,2	45,0	24,8	9,8	10,2
17	" "	218	8,4	47,1	37,4	5,5	2,3
18	" "	184	4,1	55,7	29,7	6,5	4,1
Mittelwerte:			10,2	46,4	31,4	6,4	5,6
Blutkörperchen		445	5,6	38,8	42,6	6,1	6,8
Blutkörperchen		226	5,5	35,8	46,0	10,5	2,2
Serum		230	8,7	57,5	30,5	2,2	1,0
Serum		300	6,6	38,7	37,2	14,7	2,5
Mittelwerte:			6,6	42,7	39,1	8,3	3,1

Die aus den Papierchromatogrammen ermittelten Werte für die Gesamtphosphatide differieren erheblich und sagen über den Gesamtphosphatidgehalt des einzelnen Thrombus nichts

aus, da sie von den aufgetragenen, noch dazu sehr kleinen Mengen (χ -Bereich) abhängig sind.

Entscheidend ist hier die qualitative Zusammensetzung der Phosphatide untereinander; es lassen sich einige dem Rahmen der Arbeit entsprechende Aussagen machen: Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Thrombenarten sind nicht feststellbar. Den Hauptanteil der Phosphatide stellen, wie man bereits aus dem Chromatogramm I (Photo I) schließen konnte, die Lecithinfraktion mit 46,4 und die Sphingomyelinfraktion mit 31,4% dar. Allerdings sind die Schwankungsbreiten ($\pm 11,4\%$ für Lecithin; $\pm 8,8\%$ für Sphingomyelin) relativ groß. Ursächlich kommen neben methodischen Fehlern und Verunreinigungen auch physiologische Schwankungen im Bereich der Norm in Betracht. So enthält die Lecithinfraktion Plasmalogen als Verunreinigung in unterschiedlichen Mengen. Dies geht aus dem Papierchromatogramm II hervor, auf dem solch Beimengungen durch die Ninhydrinfärbung deutlich werden.

Vergleicht man die erhaltenen Mittelwerte der Thromben mit denen der Blutkörperchen und des Serums, so ergibt sich in etwa der gleiche Lecithingehalt. Er unterscheidet sich jedoch erheblich von den in der Literatur angegebenen Serumwerten. Nach Thannhauser (101) und Schettler (89,90) liegt der Lecithingehalt zwischen 60 und 95% der Gesamtphosphatide; Leuthard (59) errechnete einen Mittelwert von 75%.

Die Angaben sind jedoch mit Vorbehalt zu vergleichen, da sie nur zwischen Lecithinen, Sphingomyelinen und Kephalinen unterscheiden. Zöllner (110) teilte mit Hilfe der Säulenchromatographie insgesamt fünf verschiedene Phosphatidkomponenten auf und errechnete den Lecithinanteil mit 66,8%. In dieser Arbeit konnten die Phosphatide ebenfalls in fünf Fraktionen getrennt werden. Die Differenz von rund 20% zwischen unseren Ergebnissen und denen von Zöllner betrifft den Sphingomyelingehalt, der bei Vergleichsuntersuchungen am Normalserum 33,8% und an Thromben 31,4% beträgt. Thannhauser, Leuthardt und Schettler hinge-

gegen errechnen für Sphingomyelin nur 10%. Zöllner findet säulenchromatographisch 16.8% Sphingomyelin in den Gesamthosphatiden. Diese Diskrepanzen lassen sich kaum mit einem Fehler der Methodik erklären. Es ist auffallend, daß auch das Papierchromatogramm Lecithin und Sphingomyelin in etwa gleich großen Flecken mit annähernd gleicher Farbinintensität aufweist. Ebenso wenig kann die Qualität der Testsubstanzen angezweifelt werden, die die Fleckidentifizierung ermöglichten. Die Frage nach der möglichen Ursache dieser unterschiedlichen Werte muß offen gelassen werden.

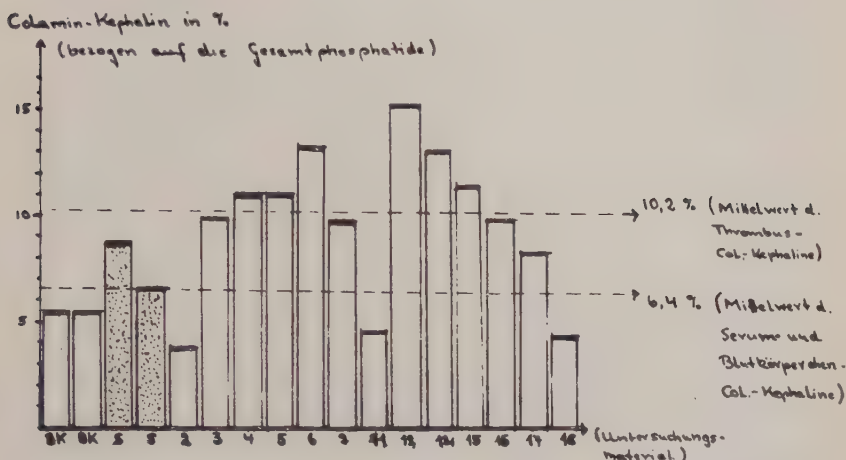
Die Werte der Lysophosphatide (Lysokephaline und -lecithine) schwanken innerhalb der Blutgerinnsel stark. Der Mittelwert liegt bei den Thromben um 6,4, bei den Vergleichsuntersuchungen am Serum bei 8,4%. Zöllner ermittelte an Normalseren für Lysolecithine 7,7 und für Lysokephaline 1,9%. Sie stimmen mit unseren Thrombenwerten weitgehend überein. Beziehungen zwischen dem Gehalt an Lysoverbindungen und der Morphe der Thromben lassen sich nicht sicher erkennen. Auffällig ist der hohe Lysogehalt des Cruorgerinnsels Nr. 3.

Die Thrombenphosphoinositide sind gegenüber denen der Seren und Blutkörperchen deutlich vermehrt.

Die Werte für das Colamin-Kephalin liegen bis auf wenige Ausnahmen für alle Thromben in etwa der gleichen Größenordnung. Sie haben einen mittleren Gehalt von 10.2% an Colamin-Kephalinen (bezogen auf die Gesamthosphatide). Dieser Wert liegt damit um rund 4% über dem der Blutkörperchen und um 6,4% über dem des Serums. Vergleicht man den Normalserumwert von 7,6% Colaminkephalin mit den Serumwerten anderer Autoren, so zeigt sich eine gute Übereinstimmung: Thannhauser ermittelte für Kephaline 5 (Mittelwert), Leuthardt 7,5 (Mittelwert) und Zöllner 4.1%.

Die folgende graphische Darstellung soll den unterschiedlichen Colamin-Kephalingehalt zwischen Thromben, Normalserum(s) und Blutkörperchen (BK) veranschaulichen:

Graphische Darstellung IV:



4. Cholesterinbestimmung

Im Anschluß an die Bestimmung der Phosphatide werden die Werte für das Gesamtcholesterin ermittelt. Die Unterteilung in freies und verestertes Cholesterin wird nicht durchgeführt, da sie im Hinblick auf die eingangs formulierte Fragestellung von untergeordneter Bedeutung ist.

Die Bestimmung erfolgt in Anlehnung an die von Schoenheimer und Sperry (92) angegebene Methode:

Es stehen die Lipide der Chloroform-Methanol-Extraktion zur Verfügung. Von dieser werden einige ml in tarierte Reagenzgläser gefüllt, zur Trockne eingedampft und gewogen. Entsprechend dem ermittelten Gewicht werden die Lipide in einem bestimmten Volumen Äther-Aethanol (1:1 V.T.) wieder gelöst, so daß die Lösung pro ml Volumen 1 mg gelöste Lipide enthält. Von diesem Gemisch werden in zweifacher Ausführung je 2,5 ml entnommen und in Zentrifugengläser gefüllt. Zunächst müssen die veresterten Anteile des Cholesterins mit methanolischer Kalilauge (50 gr. KOH in 100 ml 50%igem Methanol) verseift werden. Die Lösung wird anschließend mit 10%iger Essigsäure neutralisiert, bzw.

ganz schwach angesäuert und mit Digitonin versetzt. Dabei fällt das Cholesterin als Digitonid aus. Der gewaschene und abzentrifugierte Niederschlag ergibt mit Essigsäureanhydrid p.a. und mit 97%iger Schwefelsäure (20:1 V.T.) eine charakteristische Grünfärbung (Liebermann-Burchardt'sche Reaktion), deren Intensität auf colorimetrischem Wege bestimmt wird. Die Farbreaktion beruht auf der Bildung salzartiger Verbindungen der Schwefelsäure mit der ungesättigten Gruppe des Cholesterins. Die colorimetrische Messung erfolgt mit dem Eppendorf-Photometer, Filter "Hg 578", Schichtdicke $d=2$ cm; abgelesen wird gegen Wasser. Der Gesamtcholesteringehalt ergibt sich aus den erhaltenen Extinktionen unter Berücksichtigung der benutzten Verdünnung und der Eichkonstanten.

Ergebnisse:

Die folgende Tabelle VII enthält die relativen und absoluten Werte in mg. Außerdem werden die prozentualen Anteile des Gesamt-Cholesterins, bezogen auf das Trockengewicht der Thromben, angegeben.

Der Anteil des Gesamt-Cholesterins an den Gesamtlipiden ist unterschiedlich. Es ist jedoch ersichtlich, daß rote Thromben wenig, gemischte und weiße Thromben mehr Cholesterin enthalten. Der Cholesteringehalt der Gerinnsel ähnelt denen der weißen Thromben.

Vergleicht man die Gesamtcholesterinwerte in Normalseren (26 - 34% bezogen auf die Gesamtlipide) mit denen der Thromben (rund 10%), so liegen die letzteren mit rund 20% unter ihnen. Zöllner wies in Übereinstimmung mit anderen Autoren auf die Abnahme des Cholesterins in Lipidextrakten hin, die länger als einige Tage stehen. Da die vorliegende Cholesterinbestimmung erst einige Wochen nach der Lipidextraktion erfolgte, ist mit einer Abnahme des Cholesteringehaltes zu rechnen. Abgesehen von dieser zeitbedingten Beeinflussung scheint der Cholesteringehalt tatsächlich in Thromben wesentlich niedriger als in Normalseren zu sein.

Tabelle VII:

lfd.Nr.	Art des Blutgerinn- sels	Gesamt- lipide (mg)	Gesamt- chole- sterin (mg)	Cholesterinanteile in %	
				bez.auf Gesamt- lipide	bez. auf Trocken- gewicht
1	Speckhaut	84,2	10,0	11,9	0,86
2	Speckhaut	96,7	16,2	16,8	0,94
3	Cruor	45,3	4,7	10,4	0,32
4	rote Thromben	56,1	3,8	6,8	0,17
5	" "	7,2	0,3	4,1	0,18
6	" "	18,9	1,9	10,2	0,68
7	gemischte "	100,0	10,5	10,5	0,25
8	" "	86,6	8,2	9,5	0,64
9	" "	165,4	24,1	14,6	1,06
10	" "	71,9	4,3	6,0	0,41
11	" "	948,3	130,0	13,7	1,43
12	weiße "	51,1	5,2	10,1	1,03
13	" "	134,7	14,3	10,6	1,23
14	" "	33,8	2,6	7,6	0,97
15	" "	10,5	0,6	6,0	0,41
16	" "	49,0	14,8	30,2	4,18
17	" "	171,5	29,2	17,0	2,39
18	" "	291,8	31,5	10,8	2,53

Diskussion:

Eine Beurteilung der Ergebnisse der lipidchemischen Thrombenanalyse ist nur unter Heranziehung von Vergleichswerten möglich. Die zur Verfügung stehenden Analysenwerte anderer Autoren beziehen sich allerdings nicht auf Thromben, sondern auf Blutkörperchen bzw. Seren. Gerinnsel sind jedoch weder als reine Anhäufungen von Blutkörperchen noch als Ausfällungen von Serumbestandteilen anzusprechen.

Grundsätzlich muß zwischen Cruorgerinnseln, roten und weißen Thromben unterschieden werden. Während die Cruorgerinnsel und die roten Thromben die charakteristische Folgen eines plötzlichen Blutstillstandes, sei es postmortal oder intra vitam, darstellen und damit die stagnierende Blutssäule mit all ihren Elementen verkörpern, beschränkt sich der Aufbau des weißen Thrombus auf einzelne Blutbestandteile. Wie schon im ersten Teil ausgeführt wurde, dürften etwa abgelagerte Lipide mannigfaltigen Veränderungen unterworfen sein. Die Frage nach der Resorption, Phagozytose, Diffusion und Phanerose innerhalb des Thrombenverbandes ist keineswegs geklärt.

Aus naheliegenden Gründen war die gezielte Untersuchung von Serum und Thrombus an demselben Patienten nicht möglich. Vielleicht hätten sich hieraus Hinweise auf Speichervorgänge sowie selektiver Ablagerung von Lipiden in Thromben ableiten lassen.

Unter den genannten morphologischen Gesichtspunkten können vergleichende Schlüsse nur zwischen nahezu frischen Produkten der Blutgerinnung, also Cruorgerinnseln, roten Thromben und Normalseren gezogen werden. Die Werte der Normalseren und der der Blutkörperchen stammen von den Autoren: Bloom, Braunsteiner, Leuthardt, Pankred, Schettler, Tannhauser, Wislocki u.a. und aus eigenen Untersuchungen (mit dem Vorteil der gleichen Labortechnik).

Die erste Frage bezieht sich auf die Gesamtlipide: Wie verhält sich der auf das Trockengewicht bezogene Gesamtlipidgehalt einzelner Thromben zu dem durch Addition

zu ermittelnden Gesamtlipidgehalt von Serum und Blutkörperchen (Mittelwerte)?

Die wahrscheinliche Verteilung der Gesamtlipide auf Blutkörperchen und Plasma wird am Beispiel des Cruorgerinnsels (Nr. 3) errechnet:

Das Blut und damit auch das stagnierende setzt sich normalerweise aus annähernd gleichen Teilen Blutkörperchen und Plasma zusammen. Unter Vernachlässigung der quantitativ nicht ins Gewicht fallenden Thrombocyten und Leucocyten (zusammen 4,1% aller Blutkörperchen) sind die Erythrocyten zur Hälfte am Frischgewicht von rund 5 g Cruor beteiligt. Erythrocyten haben einen Wassergehalt von 69% (Pankred-81). Bei 2,5 g Ausgangsgewicht ergeben sich 31% oder 0,775 g Trockensubstanz. 100 g Erythrocyten-Trockensubstanz enthalten nach Pankred 1,45 g Gesamtlipide, damit enthalten 0,775 g Erythrocyten 11,2 mg.

Die restlichen 50 % des Cruorgerinnsels setzen sich aus dem Plasma und dessen Bestandteile zusammen. 100 g Plasma enthalten rund 700mg Gesamtlipide (Schettler 89), die vorliegenden 2,5 g Frischgewicht demnach 17,5 mg. Die Trockensubstanz des Cruorgerinnsels sollte also nach Addition beider Werte einen Gesamtlipidgehalt von 28,7 mg aufweisen. Der gefundene Wert liegt aber bei 45,3 mg, also um rund ein Drittel höher als der errechnete.

Untersucht man die Verhältnisse bei den roten Thromben 4 und 5, so zeigen sich auch hier deutliche Unterschiede zwischen nachgewiesenen und errechneten Werten:

Thrombus Nr. 4:	nachgewiesen	56,1 mg;	errechnet	42,8 mg.
Thrombus Nr. 5:	"	7,2 mg;	"	5,7 mg.

Die übrigen Thromben sind nicht frisch genug, um verwertet werden zu können.

Der tatsächlich gefundene Wert setzt sich also nicht nur aus den Lipiden von Blutkörperchen und Plasma zusammen, sondern bezieht seine Lipide offenbar auch aus anderen Quellen, die in erster Linie in dem erhöhten Plasmalipidspiegel zu suchen sein werden, unter Umständen auch in

einer nachträglichen Speicherung von Lipiden, die im Falle des Cruorgerinnsels und der roten Thromben sehr rasch vonstatten gegangen sein müßte. Der Lipidgehalt der Erythrocyten selbst bleibt relativ konstant (Pezold - 75), allenfalls kann ein gleichwertiger Austausch von Plasma- und Erythrocytenlipiden (dies betrifft insbesondere das Cholesterin) vonstatten gehen. Auf Grund dieser Überlegung, kann man annehmen, daß sich nicht nur der normale Plasmalipidspiegel dem Thrombus unmittelbar mitteilt, sondern auch pathologisch - im Sinne einer Hyperlipidämie - veränderte Seren den tatsächlichen Gehalt der Thromben an Lipiden stark beeinflussen.

Gerinnungsthromben sind im Gegensatz zu Agglutinationsthromben fettarm. 56% ihrer Lipide bestehen aus Phosphatiden, 8-10% aus Cholesterin und rund 35% aus Neutralfetten und freien Fettsäuren.

Die Serumwerte gesunder Personen liegen bei 26-32% Phosphatiden, 26-34% Cholesterin und 30-42% Neutralfetten, freien Fettsäuren, fettlöslichen Hormonen und Vitaminen (bezogen auf den Gesamtlipidspiegel) (Pezold). Der Phosphatidgehalt ist demnach in Gerinnungsthromben um rund 25% höher, der Cholesteringehalt um rund 20% niedriger als im Serum; Neutralfette und freie Fettsäuren sind annähernd gleich. Gemischte und weiße Thromben zeigen einen ähnlich hohen Phosphatidgehalt (43.9 - 73.2%) bei niedrigem Cholesterinwert.

Während der absolute Lipidgehalt zwischen roten und weißen Thromben erheblich differiert, ist die relative Zusammensetzung der Lipide, insbesondere die der Phosphatide, auffallend gleich (wie schon aus den Papierchromatogrammen, Photos I-III, zu ersehen ist).

Bezüglich der Zusammensetzung der Phosphatide liegen bei allen Thromben die Werte für Colamin-Kephalin etwa 3% höher als eigene Normalserumwerte und 5-6% höher als die Werte von Hack (42) und Zöllner (110). Die Erhöhung ist bei weißen Thromben ausgeprägter als bei roten.

Alle Thrombenlipide enthalten durchschnittlich 20% weniger Lecithin und rund 20% mehr Sphingomyelin (bezogen auf die Gesamtposphatide) als Serumlipide.

Ausgehend von den Ergebnissen am Cruorgerinnsel Nr.3 ist es jedoch sehr unwahrscheinlich, daß die Plasmalipide eine derartige Verschiebung zwischen Phosphatid- und Cholesteringehalt wie oben beschrieben zu Zeiten der Thrombenbildung erfahren. Der oft in der Literatur diskutierte Cholesterin-Phosphatid-Quotient (im Plasma normalerweise 1-1,3 - Ahrens, Kunkel (1)) müßte weit über 1 erhöht sein. Wir möchten daher eher eine starke sekundäre Zunahme der Phosphatide bei schwachem Absinken der Cholesterinwerte annehmen.

Die besondere Stoffwechselaktivität der Phosphatide, ihre Rolle als Lösungsvermittler innerhalb des Plasmas und an Grenzflächen ist bekannt. Eine nachträgliche Phosphatidanreicherung ist denkbar. Darüber hinaus soll aber an der besprochenen Vorstellung einer echten Phosphatidvermehrung im Plasma als thrombosebegünstigendem Faktor festgehalten werden. Das heißt für die 15 untersuchten Thromben: Ihre Entstehung steht unter Umständen in direktem Zusammenhang mit einer Erhöhung der Serumlipidwerte, insbesondere der der Phosphatide, im Sinne einer Hyperphosphatidämie.

Teil III

Atiologische Grundlagen

Weder die histologische noch die lipidchemische Untersuchung der Thromben läßt den Umfang der Lipidbeteiligung an thrombotischen Prozessen befriedigend erkennen. Zur weiteren Klärung werden die Krankengeschichten der Patienten und die autoptischen Befunde herangezogen. Leider sind die klinischen Unterlagen aus der Sicht unserer Fragestellung unvollkommen. Die klinisch-chemischen Lipiduntersuchungen wurden nur in zwei Fällen durchgeführt, gerinnungsphysiologische Daten sind ebenfalls nur da angegeben, wo eine Thrombose klinisch besonderes Interesse fand. In all den Fällen, in denen die thrombotischen Komplikationen nicht diagnostiziert wurden, können wir über die Höhe der Serumwerte nur Vermutungen anstellen. Oft entwickelte sich ein Thrombus auch erst in den letzten Tagen bzw. Stunden ante finem.

Den statistischen Erhebungen der Schweizer Pathologen Werthemann und Rutishauser (107) zufolge ergab das Sektionsmaterial aus der medizinischen Klinik der Jahre 1950-52, daß 63,6% aller Thrombembolien klinisch nicht diagnostiziert und nur 36,4% erkannt bzw. vermutet wurden. Dieser erstaunlich hohe Prozentsatz kann nicht auf eine mangelhafte klinische Untersuchung zurückgeführt werden. Das Krankheitsbild der Thrombose ist leider so komplex, und seine vielschichtig auslösenden Faktoren sind so zahlreich, daß sie nicht immer erfaßt werden können.

Im folgenden gehen wir von den Erkrankungen aus, bei denen erfahrungsgemäß mit thrombembolischen Komplikationen gerechnet werden muß. Rutishauser und Werthemann stellten die Herz- und Kreislauferkrankungen als häufigste Grundleiden mit thrombembolischen Komplikationen fest. Sie umfassen 43,3% aller autoptisch gesicherten Thrombembolien. Ihnen folgen die marantischen und kachektischen Zustände mit 22,3% und Infektionskrankheiten verschiedener Genese mit 21,2%. An vierter Stelle stehen als Grundkrankheiten

die Thrombosen mit 9,5%. Die restlichen 3,8% nehmen verschiedene Grundleiden ein, unter denen besonders der Diabetes, das Myxödem und das nephrotische Syndrom hervorgehoben werden sollen. In der Zusammenstellung fehlen die thrombembolischen Vorfälle nach Traumen, Geburten und Operationen, da es sich um statistisches Material aus einer internen Abteilung handelt.

Bei der Durchsicht der vorliegenden Krankengeschichten findet man die gleichen Diagnosen wieder. Prozentuale Angaben lassen sich auf Grund des geringen Materials nicht machen.

Unter Vernachlässigung des Strömungs- und des muralen Faktors, gilt hier unser besonderes Interesse der humoralen Situation bei der Thrombenbildung, soweit sie sich unter Hinzuziehung der klinischen Angaben objektivieren läßt.

Folgende Frage soll geklärt werden: Sind wir berechtigt, den Lipiden des Blutes, insbesondere den Phosphatiden, eine ausschlaggebende Rolle bei der Thrombose zuzuschreiben, oder kommt diesen Lipiden eine nur mitbestimmende oder gar untergeordnete Bedeutung zu?

Die lipidadrmen roten Thromben und Gerinnsel weisen annähernd einen Gesamtlipidgehalt auf, der den normalen Serumlipidwerten nahe kommt (wobei unterstellt wird, daß Cruorgerinnsel frisch gewogen der gleichen Menge Vollblut entsprechen). Sie werden nicht weiter berücksichtigt.

Die lipidreicheren Thromben lassen sich in zwei Gruppen einteilen: 1) Thromben (6,10,18,11,13,14,15.), deren Fett in Form von extra- und intrazellulären Ablagerungen über den gesamten Thrombus verteilt ist. Hier werden wir mit Blutlipidwerten zu rechnen haben, die während der ganzen Entstehungszeit erhöht waren, was im Falle der weißen Thromben einige Stunden bis Tage bedeuten würde. -

2) Thromben (5,8,9,12), in denen die Lipide in mehr oder weniger schmalen Grenzschichten abgelagert worden sind. In diesen Fällen machen wir den Einfluß einer alimentären bzw. einer plötzlich einsetzenden Lipämie (z.B.nach Ope-

rationen) verantwortlich.

ad 1)

Thrombus Nr. 6:

Histologie: Roter Gerinnungsthrombus, der als 8 cm langer Verschuß der Art mesent. cran. in die Aortenlichtung hineinragt. Lipidreich, wobei die Lipide vorwiegend im Bereich des weißen Kopfes, extra- sowie intrazellulär abgelagert, gefunden werden. Das extrazelluläre Fett liegt in Form dicht nebeneinander ausgefallener Chylomikronen vor. Keine großtropfigen Ausfällungen. Vereinzelt Chylomikronen im roten Anteil.

Chemische Analyse:

Gesamtlipide:	6,74%	} bezogen auf Trockengewicht.
Gesamtcholesterin:	0,68%	

Unter den Phosphatiden gehören 13,2% der Colamin-Kephalin-Fraktion, 42,8% der Lecithin- und 39,2% der Sphingomyelinfraktion an.

Bei der 63jährigen Patientin waren seit einigen Jahren ein erhöhter Blutdruck und Herzbeschwerden bekannt, sonst leere Anamnese. Zwei Tage vor klinischer Einweisung plötzliche Oberbauchbeschwerden, die vermutlich von dem Verschuß der Art. mesent. cran. herrührten. Bei stationärer Aufnahme bestanden Bewußtlosigkeit, Hemiparese und weite Pupillen. Kurze Zeit später Exitus im Kreislaufversagen. Autopsisch wurde eine allgemeine, schwere Arteriosklerose mit Aufbrüchen in der Intima und Atheromen festgestellt. Daneben Verschielung des hypertrophen Herzens und Liposklerose der Coronargefäße. Zwei organisierte Thromben in der Art. basilaris.

Die akute Thrombembolie, verbunden mit dem histologisch sowie auch chemisch nachweisbaren relativ hohen Lipidgehalt, läßt die Annahme einer plötzlichen Störung des Gerinnungssystems durch Lipide im Sinne einer Hyperkoagulabilität nicht unberechtigt erscheinen. Der Gehalt an Colamin-Kephalin ist im Vergleich zu den anderen Thromben

und den normalen Serumlipidwerten recht hoch. Man darf in diesem Fall einen unmittelbaren Einfluß auf die Gerinnung annehmen.

Thrombus Nr. 10:

Gemischter Thrombus mit Überwiegen der weißen Anteile aus der Vena fem. prof. Histologie: Der Bau des Thrombus ist in Etappen vor sich gegangen; deutlich setzen sich die einzelnen Abschnitte voneinander ab. Schon bei Lupenbetrachtung sind dicktropfige Lipidausfällungen als Ergebnis einer (möglicherweise alimentären) Lipämie erkennbar. Die Lipidausfällungen haben sich auf eine einzige Stelle konzentriert und begrenzen hier zusammen mit Thrombocyten eine rote Schicht. Die Form ihrer strömungsgerechten Ablagerung wurde schon im Teil I erwähnt. Die Lipide liegen ausschließlich extrazellulär vor. Bei stärkerer Vergrößerung lassen sich auch in anderen Abschnitten Lipide nachweisen; hier überwiegen die intrazellulären Speicherformen, quantitativ sind sie jedoch von geringerer Bedeutung.

Chemische Analyse:

Gesamtlipide:	6,99 %)	) bezogen auf Trockengewicht.
Gesamtcholesterin:	0,41%	

Der chemisch ermittelte Lipidgehalt liegt niedriger, als das histologische Bild vermuten läßt.

Der rein weiße Agglutinationsthrombus Nr. 18 stammt von der gleichen Patientin (aus dem linken Ventrikel) und wird an dieser Stelle vorweggenommen.

Histologie: Fächerförmig ausgebreiteter Thrombus, der sowohl im Quer- als auch im Längsschnitt sehr kompakt erscheint. Außerordentlich lipidhaltig. Das Fett liegt über allen Abschnitten gleichmäßig verteilt in Form kleinerer und größerer Chylomikronen vor. Es überwiegt die extrazelluläre Ablagerung. Daneben finden sich auch Zonen mit dichter gelagerten Chylomikronen; sie können als Hinweis für eine stattgehabte alimentäre Lipämie gelten. Im

Gegensatz zum Thrombus Nr. 10 sind großtropfige Ablagerungen selten.

Chemische Analyse:

Gesamtlipide:	23,41%	) bezogen auf Trockengewicht.
Gesamtcholesterin	2,53%	
Gesamtphosphatide:	50,4 %	) bezogen auf die Gesamtlipide.

Sie teilen sich auf in 4,1% Colamin-Kephalin, 55,7% Lecithin, 29,7% Sphingomyelin, 6,5% Lysophosphatide und 4,1% Phosphoinositide.

Der chemisch ermittelte, hohe Lipidgehalt entspricht dem histologischen Bild. Die Phosphatide dürften beim Thrombus 10 in ähnlichen Relationen vorliegen. Sie sind nicht bestimmt worden.

Bei der 66jährigen, stark adipösen Patientin bestand ein klinisch manifestes Myxoedem verbunden mit einer geringen Hypertonie, Linkshypertrophie und Dilatation des Herzens, generalisierten Oedemen und erhöhtem Serum-Cholesterinwert von 439 mg%. Unter der Behandlung mit Schilddrüsenpräparaten ging das Gewicht von 87 auf 74 kg zurück. Unter sternocardischen Anfällen kam es zu Veränderungen im EKG, die Verdacht auf Herzinfarkt erregten. Die Entwicklung einer Beinvenenthrombose konnte auch durch gezielte Therapie nicht verhindert werden. Der Exitus erfolgte im Kollaps nach Lungenembolie. Die Obduktion ergab eine chronische Thyreoiditis mit weitgehendem Parenchymschwund. Als Folge der hochgradigen Hypothyreose hatte sich eine schwere, allgemeine Arteriosklerose, besonders an den Coronargefäßen, herausgebildet. Es fanden sich ausgedehnte, rezidierte Infarkte mit chronischem Herzwandaneurysma, junge Narben und frische Nekrosen, die auf einen thrombotischen Verschuß zurückzuführen waren. Über den Infarktgebieten der linken Kammer lagen ausgedehnte, parietale Thromben. Als Emboliequelle für die rezidierten Lungeninfarkte kamen die Thrombose der Bein- und Beckenvenen in Betracht. Bei chronischer Herzinsuffizienz fanden sich eine Stauungs-

induration der Lunge und schwere, chronische Stauungen im großen Kreislauf mit generalisierten Oedemen.

Im Gegensatz zur Hyperthyreose wird das Myxödem von einem Anstieg des Blutfettspiegels begleitet. Diese Erhöhung betrifft vornehmlich das Cholesterin und seine Ester, daneben auch die Phosphatide und die freien Fettsäuren; der Anstieg der Neutralfette bleibt gewöhnlich gering. Nach Pezold (75) sind die Hypercholesterinämie und die Hyperlipidämie brauchbare Gradmesser zur Beurteilung des sich unter der Therapie zurückbildenden Myxoedems.

Der erhöhte Lipidspiegel im Blut, der durch die konsequente Abmagerungskur nur noch verstärkt worden ist (Transporthyperlipidämie), findet seinen Niederschlag in beiden Thromben (Nr. 10 und 18). Bemerkenswert ist die hohe Phosphatidkonzentration bei geringem Cholesteringehalt. Das Colamin-Kephalin ist nicht erhöht (verglichen mit Serumnormalwerten), dafür ist der Lecithingehalt im Vergleich zu den anderen Thromben erhöht, der Sphingomyelingehalt entspricht den bei anderen Thromben gefundenen Werten.

Abgesehen von einer möglichen Beteiligung der Lipide, besonders der alimentär im Blut erscheinenden, begünstigen in diesem Fall die Stauung im großen Kreislauf und die relative Bewegungslosigkeit der Extremitäten (infolge Bettruhe, Fettleibigkeit und vermindertem Antrieb) die Thrombenbildung. Ferner dürften die arteriosklerotischen Veränderungen an den Gefäßen im Sinne des muralen Faktors eine Rolle spielen. Die zum Symptomenkreis der Hypothyreose gehörende beschleunigte Blutsenkung und die Erhöhung der Blutviskosität dürften ebenfalls fördernd auf die Thrombenbildung wirken.

Thrombus Nr. 11:

Der 43 g schwere, daumendicke, ältere Parietalthrombus, weiß gemischt mit einigen roten Anteilen, entstammt der Bauchaorta, wo er an der dorsalen Wand fixiert war und vom Abgang der Art. coeliaca bis über die Aortengabel hinausreichte.

Histologie: Der Thrombus zeigt teilweise Organisationsvorgänge mit einwucherndem, bindegewebigem Zellmaterial und Kapillarsprossungen. Die weißen Agglutinationsanteile erscheinen auffallend homogen, es läßt sich in ihnen kaum Fibrin nachweisen. Wahrscheinlich handelt es sich um eine besonders rasche Agglutination von Thrombocyten in einem Umfang, der in der untersuchten Thrombenserie einmalig ist. Er gehört zu den lipidreichen Thromben. Das Fett ist größtenteils fein verteilt (mehr extra- als intrazellulär), wird aber in den Außenbezirken des Thrombus, und zwar in den Teilen, die der Gefäßlichtung zugekehrt waren, großtropfig und dichter. Die wenigen roten Anteile enthalten kein Fett.

Chemische Analyse:

Gesamtlipide:	10,44%)	
Gesamtcholesterin	1,43%)	bezogen auf Trockengewicht
Gesamtposphatide:	49,4%	(bezogen auf Gesamtlipide).

Diese setzen sich zusammen aus: 4,8% Colamin-Kephalin, 50,3% Lecithin, 37,6% Sphingomyelin, 4,5% Lysophosphatiden und 2,9% Phosphoinositiden. Der hohe Lipidgehalt entspricht den histologischen Befunden.

Der weiße Agglutinationsthrombus Nr. 13 stammt vom selben Patienten. Er wurde als parietaler, doppelt-daumengroßer, lipidreicher Thrombus im spitzennahen Teil und in der Ausflußbahn des linken Ventrikels gefunden. Wie schon im Teil I beschrieben wurde, imponieren die Lipidablagerungen gemeinsam mit Leucocyten am Rande der Thrombocytenausfällungen als perlschnurartige Säume (siehe Zeichnung Seite 23).

Chemische Analyse:

Gesamtlipide:	11,59%)	
Gesamtcholesterin:	1,23%)	bezogen auf Trockengewicht.

Die Phosphatide wurden im Hinblick auf die Ähnlichkeit dieses Thrombus mit dem vorigen nicht näher untersucht. Auf der Abbildung des Papierchromatogramms erscheinen die Colamin-Kephalin-Flecke beider Thromben gleich klein.

Menge, Zusammensetzung und Ablagerungsart der Lipide in beiden Thromben lassen sowohl an eine allgemeine Vermehrung der Plasmalipide als auch an eine oder mehrere sich überschneidende alimentäre Lipämien denken. Der hohe Anteil der Phosphatide an den Gesamtlipiden ist auffallend. Wie schon im Teil II ausgeführt wurde, liegen die normalen Serumphosphatidwerte wesentlich niedriger. Colamin-Kephalin ist nicht erhöht.

Bei dem 55jährigen, adipösen Patienten (früher Alkoholiker) bestanden seit 12 Jahren Durchblutungsstörungen beider Hände und Beine, die 1961 eine Amputation des rechten Unterschenkels und eine linksseitige Sympathectomie zur Folge hatten. 1960 wurde eine Gefäßplastik in der linken Art. iliaca notwendig. Die jetzige Klinikaufnahme erfolgte wegen plötzlicher Schmerzen im linken Unterbauch, die von dem autoptisch gesicherten thrombotischen Verschuß der Aorta und der linken Art. iliaca herrührten. Der Exitus erfolgte im linksseitigen Herzversagen bei Lungenödem. Die Sektion ergab ein vergrößertes, dilatiertes Herz mit zahlreichen Infarktschwelen und ausgedehnten, parietalen Thromben in den Trabekeln beider Ventrikel. Daneben fanden sich gehäuft alte und frische Infarktnarben an Milz und Niere. Bis auf eine geringe Lipoidose und Fibrose im Thrombenbereich fanden sich keine arteriosklerotisch veränderten Gefäße. Es gab keine Anhaltspunkte für das Vorliegen einer Arteriitis. Die generalisierte Thrombembolie des Patienten wurde offensichtlich allein durch humorale Faktoren bestimmt. Klinische Daten bezüglich der Gerinnungsfaktoren sind nur sehr unvollständig vorhanden. Lipidwerte liegen nicht vor. Die Therapie erstreckte sich auf eine sedierende, anabolische, entwässernde und herzustützende Behandlung. Eine Antikoagulantientherapie wurde nicht durchgeführt.

Bei der lipidchemischen Thrombenuntersuchung fiel der hohe Phosphatidgehalt auf. Möglicherweise haben die Phosphatide den humoralen Faktor im Sinne einer Hyperkoagulabilität beeinflusst.

Thrombus Nr. 14:

Rein weißer Agglutinationsthrombus aus der rechten Vena fem. Histologie: Keine wesentlichen Organisationszeichen. Lipidhaltig. Das Fett ist über den ganzen Thrombus gleichmäßig verteilt, sowohl intra- als auch extrazellulär. Neben Chylomikronen und Lipophagen finden sich einzelne nadel-förmige, verschieden lange, radiär angeordnete Kristalle mit Doppelbrechung. Sie sind sudanophil. Wahrscheinlich handelt es sich hier um auskristallisierte Fettsäuren, die dem Neutralfett der Chylomikronen entstammen können (105).

Chemische Analyse:

Gesamtlipide: 12,61%) bezogen auf Trockengewicht
Gesamtcholesterine: 0,97%)

Die papierchromatographische und spektrophotometrische Bestimmung der Phosphatide ergab:

13,3% Colamin-Kephalin, 43,0% Lecithin, 27,6 % Sphingomyelin, 7,3% Lysophosphatide und 8,8% Phosphoinositide.

Die Lipidwerte liegen höher als das histologische Bild erwarten ließ.

Bei der 57jährigen, kachektischen Patientin stand ein rezidivierendes Hypernephrom im Vordergrund. 1955 Nephrektomie; spätere Rezidive wurden bestrahlt. Die Todesursache war eine akute Arrosionsblutung aus einem arteriellen Gefäßaneurysma bei Ulcus pepticum jejuni (Zustand nach Billroth-I-Resektion), Anämie sämtlicher Organe, mäßig starke Sklerose der Aorta, zarte Hirnbasis- und Herzkranzarterien. Neben dem besprochenen Thrombus wurden zwei organisierte Thromben in der Vena cava caud. und der Vena saph. dextr. gefunden.

Klinischerseits liegen keine Anhaltspunkte für die Begünstigung thrombotischer Komplikationen vor. Blutlipidwerte wurden nicht ermittelt. Unsere Befunde deuten auf eine mögliche Erhöhung der Blutlipide hin. Der hohe Colamin-Kephalin-Gehalt ist auffallend.

Thrombus Nr. 15:

Alterer, organisierter Parietalthrombus aus der Aorta abd. mit Verlegung des Abganges der Art. iliaca dextr.

Histologie: Der Thrombus zeigt verwaschene Konturen und ist dicht gepackt. Eingewanderte mesenchymale Zellelemente lassen sich bereits nachweisen. Die intrazelluläre Speicherungsform herrscht vor; teilweise sind die Lipophagen besonders dicht mit sudanophilem Material angefüllt. Daneben finden sich auch viele extrazellulär abgelagerte Chylomikronen, die in Verbindung mit den Zellen stehen. Das Fett ist über den ganzen Thrombus verstreut, in den Außenbezirken scheinen sich Chylomikronen einer alimentären Lipämie niedergeschlagen zu haben. Es zeigt sich ein breiter sudanophiler Saum.

Chemische Analyse:

Gesamtlipide:	7,14%)	bezogen auf Trockengewicht.
Gesamtcholesterin:	0,41%)	

Colamin-Kephalin-Anteil 11,5%, bezogen auf die Gesamtphosphatide.

Der 62jährige Patient (Raucher 80 Zigaretten/Tag) erlitt im Februar 1962 einen Unfall, der eine Fraktur des Beckenringes und Harnröhrenriß zur Folge hatte. Der urologisch-klinische Aufenthalt zog sich infolge verzögerter Wundheilung unerwartet lange hin und wurde durch verstärkte Schmerzen in beiden Beinen (seit Jahren Durchblutungsstörungen beider Extremitäten mit fehlenden Fußpulsen) und allgemeine Infektionen kompliziert. Der Patient kam im Kreislaufversagen unter dem Bild einer autoptisch gesicherten, abszedierenden Bronchopneumonie und Bronchitis ad exitum.

Die Obduktion ergab weiterhin einen allgemeinen schweren, septischen Zustand, daneben eine stärkere Arteriosklerose, von der besonders die abdominalen Teile der Aorta befallen waren, eine fast völlige Obliteration der rechten Art. iliaca comm. und ext. (infolge des Thrombus') sowie starke Sklerose der Art. iliaca sinistra. Es bestanden einige frische Infarkte der Milz und der rechten Nierenrinde.

Die thrombotischen Komplikationen stehen in direktem Zusammenhang mit den schweren arteriosklerotischen Veränderungen. Aus dem für einen weißen Thrombus geringen Lipidgehalt ist zu schließen, daß die Fette wahrscheinlich keinen wesentlichen Einfluß auf die Thrombenentstehung gehabt haben. Auffallend ist jedoch wieder der relativ hohe Colamin-Kephalin-Wert (bezogen auf die Gesamthosphatide).

ad 2)

Thrombus Nr. 5:

10 cm langer, überwiegend roter Thrombus aus der rechten Vena fem. prof. mit weißem Agglutinationskopf.

Histologie: Festarm. Während der Mittelteil des weißen Kopfes sowie die roten Anteile von Lipidablagerungen praktisch frei sind, hat sich um den Kopf herum eine deutlich sudanophile, schmale Grenzschrift herausgebildet (siehe Zeichnung Seite 22). Das Fett liegt fein verteilt vor, sowohl extra- als auch intrazellulär gespeichert. Teilweise finden sich spindelförmige Lipophagen, möglicherweise phagozytierende Fibrinlasten.

Chemische Analyse:

Gesamtlipide:	4,26%)	bezogen auf Trockengewicht
Gesamtholesterin:	0,18%)	

Die Gesamthosphatide teilen sich in 11,3% Colamin-Kephalin, 53,3% Lecithin und 24,5% Sphingomyelin (sowie Lysoverbindungen und Phosphoinositide) auf.

Der geringe Lipidgehalt entspricht dem histologischen Befund.

Bei dem 82jährigen, kachektischen und anämischen Patientenbestanden seit langem arterielle Durchblutungsstörungen beider Beine mit erheblichen Ödemen bei Hypotonie. Seit Januar 1962 Ikterus. Exitus im März im Kreislaufversagen.

Die Obduktion ergab ein Adenocarcinom des Coecums, Carcinose des Peritoneums, Diaphragmas und Omentum majus und Metastasierung in die Leber. Todesursache war das Versagen des

rechten Herzens bei degenerativer Myocardverfettung. In den Segmentästen beider Lungen fanden sich ältere und frische Thrombembolien. Die Sklerose der Gefäße war mäßig. Der lipidhaltige Bezirk des weißen Thrombenteiles ist möglicherweise zur Zeit einer alimentären Lipämie entstanden.

Thrombus Nr. 8:

Älterer, gemischter aber überwiegend weißer, nicht verschließender Thrombus aus der linken Vena femoralis. Histologie: Fettartig. Das Fett ist in Form zweier schmaler Grenzschichten, die miteinander nicht in Verbindung stehen, jeweils am Rande einer größeren gemeinsamen Thrombocytenausfällung abgelagert (siehe Zeichnung, Seite 22). Der intermittierende, appositionelle Aufbau ist besonders gut im Querschnitt zu sehen. Das Fett liegt ausschließlich extrazellulär in Form großer und kleiner Chylomikronen vor. Wieweit die sudanophile Schicht Anlaß der Thrombocytenagglutination bzw. Begrenzung einer schon vorhandenen Ausfällung darstellt, kann nicht entschieden werden.

Chemische Analyse:

Gesamtlipide: 6,79%) bezogen auf Trockengewicht
Gesamtcholesterin: 0,64%)

Die Gesamt-Phosphatide wurden aus technischen Gründen nicht bestimmt. Der histologisch gefundene Lipidgehalt entspricht dem chemisch ermittelten.

Bei dem 81jährigen Patienten lautete die klinische Diagnose Prostataadenom, Hepatitis (die auf einem frischen, dystrophischen Schub bei eitrig ascendierender Cholangitis beruhte), Kreislaufinsuffizienz und Pneumonie. Der Patient kam im rechtsseitigen Herzversagen ad exitum. Die Obduktion ergab eine Prostatahyperplasie, eine schwere, ascendierende, eitrig einschmelzende Nephritis und ein Cor pulmonale. Obwohl sich von klinischer Seite keine Hinweise auf eine Thrombose ergaben, fanden sich in den größeren und kleineren Lungenarterien zahlreiche Thrombembolien (daneben alte haemorrhagische Infarkte in allen Lungenab-

schnitten). Daneben konnte eine chronisch eitrig Bronchitis, Bronchiektasen nebst Emphysem diagnostiziert werden. Die Gefäße waren arteriosklerotisch verändert. Die Venae fem. sinistr. et dextr. enthielten umfangreiche frische und ältere Thromben. Der Modus, nach dem die Lipidablagerung erfolgte, spricht für die Auswirkung einer alimentären Lipämie. Der geringe Lipidgehalt der übrigen Thrombenanteile läßt auf einen sonst normalen Plasmalipidspiegel schließen. Pezold weist auf die regelmäßig erhöhten Lipide im Serum bei Nierenerkrankungen mit dem klinischen Bild des nephrotischen Syndroms hin. Die vorliegende Nierenauffektion hat allerdings mit einer Nephrose nichts zu tun.

Die Bildung der Thromben ist wahrscheinlich weniger durch einen humoralen Faktor in Form einer Lipidvermehrung als durch Erschwerung der Blutströmung (Rechts-Herzinsuffizienz mit Stauung vorgeschalteter Organe) beeinflußt worden. Die schweren, eitrigen Prozesse der Nieren, Gallenwege und der Lungen haben vielleicht die Thrombenentstehung begünstigt.

Thrombus Nr. 9:

Großer, gedoppelter, aufgeknäulter, überwiegend weißer Thrombembolus aus dem Conus pulmonalis.

Histologie: Lipidreich. Das Fett liegt in intra- und extrazellulärer Form vor. Neben einer geringen Verteilung über die gesamte Oberfläche hat sich die Hauptmenge in der Außenschicht in einem breiten Saum niedergeschlagen. Man findet dabei groß- und kleintropfige Ausfällungen von Lipiden (Chylomikronenaggregate).

Chemische Analyse:

Gesamtlipide: 7,28%)
Gesamtcholesterin: 1,06%) bezogen auf Trockengewicht.

Die Phosphatide machen 73,2% der Gesamtlipide aus!

Sie teilen sich wie folgt auf: 10,3% Colamin-Kephalin,
40,9% Lecithin, 41,8% Sphingomyelin und 7% Lysophosphatide.

Der ziemlich hohe Fettgehalt war nach der histologischen Untersuchung zu erwarten.

Der Thrombus Nr. 12 entstammt der gleichen Patientin und wird an dieser Stelle besprochen: Überwiegend weißer Thromboembolus aus der rechten Segmentarterie des Lungenmittellappens.

Histologie: Im Gegensatz zum Thrombus Nr. 9 erwies sich das Präparat als sehr fettarm (nur einige sudanophile Lipophagen). Das untersuchte Material entstammt dem unteren Ende des Thrombus.

Chemische Analyse:

Gesamtlipide:	10.16%) beide bezogen auf
Gesamtcholesterin:	1,03%) Trockengewicht.

Die papierchromatographische Trennung der Phosphatide ergab: 15,5% Colamin-Kephalin, 42,4% Lecithin, 27,9% Sphingomyelin, 11,2% Lysophosphatide und 3,1% Phosphoinositide. Der chemisch ermittelte, hohe Lipidgehalt läßt bei dem histologisch sehr geringen Fettgehalt eine ungleichmäßige Verteilung der Lipide über den Thrombus vermuten. Allerdings ist zu bedenken, daß phosphatidreiche Lipidgemische (wie im vorliegenden Falle) weniger sudanophil sind als neutrafettreiche.

Die prozentuale Verteilung der Phosphatide stimmt bei beiden Thromben bezüglich der Colamin-Kephaline und Lecithine annähernd überein. In der Sphingomyelinfraktion zeigen sich Abweichungen.

Die 73jährige Patientin ist nach der operativen Entfernung eines großen, verjauchten Ovarialkystoms aus der Narkose nicht mehr zu Bewußtsein gekommen. Der Tod trat infolge fulminanter Lungenarterienembolie zwei Tage nach dem operativen Eingriff ein.

Die Obduktion der stark adipösen Frau (117 kg bei 1,59 m) ergab zahlreiche, teilweise mit der Wand fest verhaftete, teilweise lose obturierende Thromben im Pulmonalarteriensystem. Das Mesovar war infolge einiger frischer und älter-

rer Thrombosierungen teilweise nicht blutdurchgängig. Am Herzen fanden sich eine degenerative Myocardverfettung sowie eine Liposklerose der Coronargefäße. Weiterhin chronische Blutstauung und Verfettung der Leber, Beinoedeme, trübe Schwellung der Niere und schwerer septischer Milztumor. Außerdem erheblich sklerosierte und stenosierte Cerebralgefäße (die Patientin verstarb unter den klinischen Zeichen eines apoplektischen Insultes); Liposklerose der Aorta und der elastischen Gefäße. Die Schenkelvenen waren beiderseits thrombosiert und Ausgangspunkt der Lungen-thrombembolie.

Thrombosen und Embolien nach operativen Eingriffen werden gefürchtet. Das vermehrte Freiwerden von Gewebsthrombo-kinase und die Aktivierung von anderen gerinnungsfördernden Substanzen spielen hierbei eine dominierende Rolle. Daneben wird man mit einer plötzlichen Vermehrung von Phosphatiden (beispielsweise gebunden an die erwähnten gerinnungs-aktiven Substanzen) im Blut rechnen können. Der besonders hohe Gehalt des Thrombus Nr. 9 an Phosphatiden (73%) spricht jedenfalls für eine solche Vermehrung der Phosphatide im Blut (im Sinne einer symptomatischen Hyperphosphatidämie nach Operationen). Ob darüber hinaus eine essentielle Phosphatidvermehrung bestanden hat, ließ sich nicht feststellen. Die Form der Ablagerung bei Thrombus Nr. 9 spricht aber eher für eine plötzliche Überschwemmung des Blutes mit Lipiden. Der auffallend hohe Colamin-Kephalingehalt (10 und 15%) beider Thromben spricht für die aktive Beteiligung dieser Substanz am Gerinnungsgeschehen.

Ergebnisse und Diskussion:

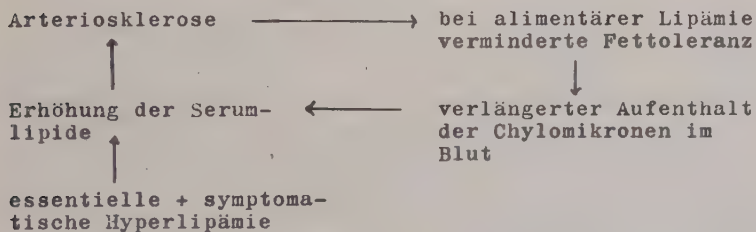
Lassen sich aus der Kenntnis von Menge und Zusammensetzung der Thrombenlipide Beziehungen zu bekannten Untersuchungsergebnissen anderer Autoren über die thrombosebeeinflussende Rolle der Blutlipide herstellen?

Aus den Krankengeschichten und Sektions-Befunden der unter

1) und 2) zusammengefaßte. Thromben ergeben sich ausnahmslos Anhaltspunkte für Hyperlipämien.

Neben der nahrungsbedingten alimentären Lipämie gibt es noch andere physiologisch erhöhte Fettspiegel (beispielsweise Beeinflussung durch Alter und Geschlecht).

Pathologische Erhöhungen der Lipide im Blut werden in die symptomatischen und essentiellen eingeteilt. In keinem der vorliegenden Fälle liegen klinische Hinweise für eine essentielle Hyperlipämie vor, dagegen aber für die symptomatischen Formen. Eine Hyperlipämie finden wir als Symptom bei Hypothyreose, beim nephrotischen Syndrom (38), beim Diabetes. Sie kann Folge eines Hungerzustandes (Mobilisation der Fette aus den Depots - Transporthyperlipämie), eines Aderlasses, von Stresssituationen und Traumen infolge Unfalls, Operationen und Geburten sein. Ein circulus vitiosus kann sich bei der ausgeprägten Arteriosklerose ergeben, die ihrerseits bei essentiellen und symptomatischen Hyperlipämiezuständen vermehrt angetroffen wird und dann zu einer verminderten Fettoleranz führt (75,68,89). Diese Herabsetzung der Toleranz macht sich in einer verlangsamten Spontanklärung des Serums bemerkbar: Chylomikronen bleiben nach einer Fettmahlzeit länger als unter gewöhnlichen Umständen im Plasma.



In der unter 1) und 2) zusammengefaßten Thrombenreihe wurden die histologischen Befunde den chemischen Analysen gegenübergestellt. Bis auf einige wenige Ausnahmen entsprachen sie sich. Da die Grenze des lichtmikroskopischen Auflösungsvermögen bei einigen hundert $m\mu$ erreicht wird, kann

die histochemische Schätzung des Thrombenlipidgehaltes die kleinsten Chylomikronen nicht mehr erfassen. Trotzdem läßt sich eine Proportionalität zwischen dem chemisch ermittelten Lipidgehalt und der Menge der histochemisch nachweisbaren Chylomikronen ableiten. Das bedeutet, daß den sichtbaren Chylomikronen hinsichtlich der chemisch-analytisch erfaßten Gesamtlipide in den meisten Fällen die größte Bedeutung zukommt. Insofern muß auch die qualitative Zusammensetzung der Chylomikronen von ausschlaggebender Bedeutung für die Relation der Thrombenlipide sein. Nach den Angaben von Pezold (75), Schettler, Eggstein und Jobst (90) setzen sich die Lipide der Chylomikronen wie folgt zusammen: Alimentäre Chylomikronen enthalten 85,5% Neutralfett, 5,8% Phospholipide, 2,8% freies Cholesterin und 4,9% Cholesterinester. Bei den Chylomikronen aus essentiell-hyperlipämischem Blut verschieben sich die Lipidrelationen auf Kosten der Neutralfette (55%) zugunsten des Cholesterins (32%) und der Phosphatide (11%).

Vergleichen wir diese Angaben mit den Thrombenlipiden, so weisen die von uns gefundenen geringen Cholesterinmengen eher auf eine alimentäre als auf eine essentielle Hyperlipämie hin, (die ja auch klinischerseits bestätigt worden wäre). Gemessen an dem unbedeutenden Cholesteringehalt scheint die alimentäre Lipämie auch bei den Thromben (Nr.10 + 18) eine überragende Rolle gespielt zu haben, die nachweislich unter dem Einfluß einer symptomatischen Hypercholesterinämie gestanden hatten. - Aus gleicher Sicht gesehen ist dann der Phosphatidgehalt der Thromben (zwischen 43,9 und 73,2%) überraschend hoch. Wir möchten für diese Erhöhung mehrere Ursachen diskutieren:

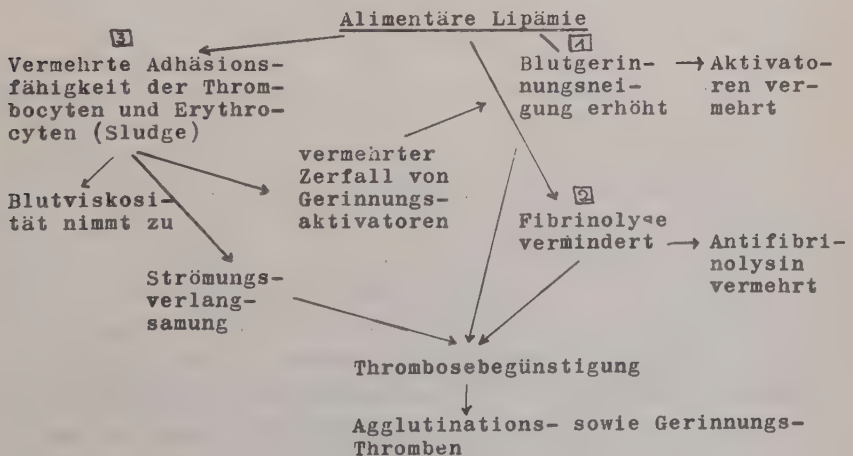
- 1) Konzentrierte Ansammlung von Erythrocythen, Thrombocyten und Leucocyten, die sämtlich einen eigenen hohen Phosphatidgehalt (rund 50% bezogen auf die Gesamtlipide) aufweisen. (Müßte allerdings auch den Cholesteringehalt etwas erhöhen)

- 2) Möglicherweise zellständige Phosphatidsynthese innerhalb des Thrombus.

- 3) Mögliche erhöhte Phosphatidsynthese in der Gefäßwand und mögliches sekundäres Infundieren in den Thrombus (gilt nur für weiße Thromben).
- 4) Temporäre Erhöhung der Phosphatide im Blut zu Zeiten der Thrombenbildung (außerhalb der Chylomikronen!).
- 5) Selektive Diffusion der Phosphatide aus dem Plasma in den Thrombus hinein. Hierbei ^{sei} besonders an die Phosphatide erinnert, die aktiv in das fibrinolytische System eingreifen.

Welche Vorstellungen hat man über Angriffs- bzw. Wirkungsweise der Serumlipide bei der Thrombenentwicklung?

Die jetzigen Meinungen bezüglich der Phosphatide wurden bereits dargelegt. Grundsätzlich sind die Einflüsse auf die Gerinnung umso stärker, je phosphatidreicher die Nahrung und damit auch die alimentäre Lipämie ausfällt. Den Triglyceriden und Fettsäuren kann man nach O'Brien (71, 72) keinen direkten Einfluß auf die Gerinnungsvorgänge zuschreiben, wohl aber einen indirekten. Aus der Fülle der Mitteilungen, die der alimentären Lipämie mit ihrer Erhöhung der Neutralfette, Fettsäuren und Phosphatide direkte Einflüsse auf die Gerinnung im Sinne einer Hyperkoagulabilität zuschreiben, werden die wichtigsten Faktoren in folgendem Schema zusammengestellt:



Faktor 1) Die Blutgerinnungsneigung ist durch folgende Veränderungen gekennzeichnet:

Verkürzung der Gesamtgerinnungszeit (Fullerton 38; Lasch, Schimpf 56; MacLagan, Billimoria 62; Schrader, Bürger 93). Verkürzung der Recalcifizierungszeit (Poole 77) und der Stypven Prothrombinzeit (Poole 77; Fullerton 38).

Vermehrte Aktivität der Faktoren V und VII, Prothrombin und Thrombokinasen (Lasch, Kahlke, Sessner, Schimpf 55) und gleichzeitig verminderte Aktivität des Progressivantithrombins (oder Antithrombin III) (Eggstein, Mammen 31; Kommerell, Berger 53).

Faktor 2) Die Thrombosegefahr wird verstärkt durch eine verminderte Fibrinolyse (Buckell, Elliot 18; Greig, Runde 39), der Antifibrinolytintiter ist erhöht. (Kommerell, Berger 53).

(Die übrigen Faktoren wurden im Vorhergehenden (siehe Teil I) bereits besprochen.)

Der physiologischen, alimentären Lipämie mit ihren Einflüssen auf die Gerinnung und damit auf die Thrombosenentstehung kommt normalerweise kaum eine Bedeutung zu. Das kann sich aber unter disponierenden Umständen (Alter, Arteriosklerose beispielsweise) ebenso ändern wie bei häufig wiederkehrenden und besonders ausgeprägten Lipämien.

Der erhöhten Gerinnungsneigung bei der alimentären Lipämie steht eine eher verminderte Gerinnungsneigung bei essentiellen und symptomatischen Hyperlipämien gegenüber. Nach Perlick (74) beruht diese auf dem vermehrten Gehalt an Antithrombokinasen und Antifibrinogenen. Man stellt sich eine Art Gegenregulation des Organismus auf die ständig erhöhten Blutlipide vor. Die latenten Gerinnungsvorgänge gehen damit auf einer anderen Ebene ein neues Gleichgewicht mit dem fibrinolytischen System ein. Auf der anderen Seite sind die fibrinolytischen Aktivitäten vermindert, wahrscheinlich über die vermehrte Bildung von Antifibrinolytinen. Dies wird sich

besonders dann unangenehm bemerkbar machen, wenn es um die Beseitigung bereits vorhandener Fibrinauflagerungen an den Gefäßen geht. "Der jeweilige Aktivitätsgrad der Fibrinolyse bestimmt das Schicksal von intramuralen Fibrinauflagerungen" (Perlick).

Was für die Arteriosklerose bezüglich ihrer verminderten Fettoleranz gegenüber alimentären Lipämien gilt, trifft auch gegenüber anderen Hyperlipämieformen zu. Diese Intoleranz erhöht sich mit steigendem Alter. Der Aufenthalt von zusätzlichen alimentären Lipiden im Blut wird dementsprechend verlängert. Man kann sich vorstellen, daß die dadurch ohnehin weniger flexiblen Gerinnungsmechanismen durch die zusätzliche Belastung der alimentären Lipide empfindlicher reagieren als unter normalen Verhältnissen. Der Thrombosegefahr wird damit Vorschub geleistet.

Somit stellen auch die essentiellen und symptomatischen Hyperlipämien neben den alimentären durchaus wichtige Faktoren im humoralen Bereich dar. Bei entsprechender Disposition (im Zusammenwirken mit muralen und haemodynamischen Faktoren) können sie zur Bildung eines Thrombus führen. Die Thrombenlipide sind dann das morphologisch und chemisch faßbare Substrat dieser Vorgänge. -

Zusammenfassung

15 verschiedene Thromben und 3 postmortale Gerinnsel aus menschlichen Leichen wurden histologisch und lipid-chemisch untersucht. Zur weiteren Charakterisierung wurden Obduktionsbefunde und Krankengeschichten herangezogen.

Histologisch finden sich intra- und extrazelluläre Lipidablagerungen diffus über den ganzen Thrombus verteilt oder konzentriert in verschiedenen Formationen. Dieser zweite Ablagerungsmodus läßt an die Folge alimentärer Lipämien denken.

Die durch Chloroform-Methanol extrahierten Lipide betragen bei roten Thromben rund 4, bei gemischten 7 und bei weißen 13% der Trockensubstanz, respektive 1; 1,5 und 3% des Frischgewichtes. Im allgemeinen decken sich die histologisch grob zu schätzenden mit den chemisch-analytisch festgestellten Gesamtlipidmengen.

Ihre qualitative Analyse ergibt anteilig 60% Phosphatide 10% Gesamtcholesterin und übrige 30% Neutralfette mit freien Fettsäuren. Die papierchromatographische Trennung zeigt eine auffallende Übereinstimmung der Phosphatidrelationen bei allen Thromben und Gerinnsel. Im einzelnen finden sich rund 10% Colamin-Kephalin, 46% Lecithin, 31% Sphingomyelin, 6% Lysophosphatide und 6% Phosphoinositide.

Mit den Lipiden eines nichtlipämischen Plasmas verglichen, fällt ein etwa 6% höherer Colamin-Kephalin- und ein rund 20% niedrigerer Cholesteringehalt auf. Die Colamin-Kephalin-Anreicherung im Thrombus spricht für deren Aktivität bei der Gerinnung. Der niedrige Cholesterinwert wird auf den entsprechenden Gehalt der Chylomikronen zurückgeführt. Für den hohen Gehalt der Thromben an Phosphatiden wird primär deren Vermehrung im Serum zu Zeiten der Thrombenentstehung, ihre sekundäre Diffusion in den Thrombus hinein und ein hoher Eigengehalt der Blutzellen an Phosphatiden verantwortlich gemacht.

Die vorliegende Untersuchung beweist histologisch und lipid-

chemisch die Existenz von Plasmalipiden in der Thromben-
struktur und läßt eine ursächliche, zumindest mitbestim-
mende Rolle bei der Thrombenentstehung vermuten.

Literaturnachweis

1. E. Ahrens, H. Kunkel: The stabilization of serum lipid emulsions by serum phospholipids.
J.exp.Med. 90, 409-423 (1949)
2. N. Anitschkow: Über die Veränderungen der Kaninchen-aorta bei experimenteller Cholesterinsteatose.
Beitrag path. Anat. 56, 379-404 (1913)
3. Armbruster, Beiss: Die qualitative Bestimmung von Phosphatiden durch Papierchromatographie.
Z.Naturforsch. 136, 79-84 (1958)
4. C. Artom: Bull. Soc. Chim. Biol. 14, 1386 (1932)
- 4a C. Artom: Cephalins, choline-containing Phospholipids and total phospholipids in normal human plasma. J.Biol. Chem. 139, 65-70 (1941)
5. L. Aschoff: Vorträge über Pathologie XI, über Thrombose. S. 230, G.Fischer Jena 1925
6. P. Barkhan: Phospholipids from brain tissue as accelerators and inhibitors of blood coagulation. Lancet 1956 II/2341
7. M. Bloom, G.B. Wislocki: The localisation of lipids in human blood and human bone marrow cells. Blood 5, 79-88 (1950)
8. W.R. Bloor: The determination of small amounts of lipid in blood plasma. J.Biol. Chem. 77 53-73 (1928)
9. F. Bode, U. Ludwig: Zur Frage der Existenz von Lipopeptiden Kli.Wo. 32, 1097 (1954)
10. St. Borgström, L.Gelin, B. Zederfeldt: The formation of vein thrombi following tissue injury.
Acta Chir. Scand. Suppl. 247, 1-36 (1959)
11. B. Borgström: Investigation on lipid separation methods.
Acta Physiol.-Scand. 25, 101-110 (1952)
12. E. Boyd: The lipid content of the white blood cells in normal young woman. J. of biol. Chem. Baltimore 101, 623-633 (1933)
13. E.M. Boyd: The extraktion of blood lipids.
J. Biol. Chem. 114, 223-234 (1936)
14. K. Brass: Aufbau und Entstehung der Beinvenenthrombose. Frankfurt Z.Path. 56, 74-176 (1942)

15. H. Braunsteiner: Physiologie und Physiopathologie der weißen Blutzellen. Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart 1959
16. G. Bruns Die lipoidigen Baustoffe des Aortenendothels. Zbl. allgem. Path. 99, 340-343 (1959)
17. F. Bschor: Zum histologischen Nachweis intravasaler Fettstoffe. Fette-Seifen-Anstrichmittel 64, 669-679 (1962)
18. M. Buckel, F. Elliot: Effect of butter lipaemia on the rate of clot lysis in normal males. Lancet 1959/I 662-663
19. F. Büchner: Allgemeine Pathologie S. 188, 3.Auflage, Urban & Schwarzenberg/München-Berlin 1959
20. N.S.Burt, R.F.Rossiter: Lipids of rabbit blood cells. Data for red cells and polymorphnuclear leucocytes. Biochem. J. 46, 569-572 (1950)
21. E. Chargaff, C. Levine, Ch.Green: Techniques for the demonstration by chromatography of nitrogenous lipid constituents, sulfur-containing amino-acids and reducing sugars. J.Biol.Chem. 175, 67-71 (1948)
22. J. Chayen: Biochem. J. 76, 148, (1960)
23. S.Chernick, R.A. Srere, J.L. Chaikoff: Metabolism of arterial tissues; lipid synthesis; formation in vitro of fatty acids and phospholipids by rat artery with C¹⁴ and P³² as indicators. J.Biol. Chem. 179, 113 (1949)
24. H.N. Christensen: The contaminants of blood phospholipids J.Biol.Chem. 129, 531-537 (1939)
25. R. Consden, A.M. Gordon, A.Martin: Biochemic J. 44, 590 (1948)
26. F. Cramer: Papierchromatographie, Verlag Chemie 4. Aufl. 1958, S. 20-31
27. T. Crawford, C. Levene: The incorporation of fibrin in the aortic intima. J. Path. Bact. 64, 523-528 (1932)
28. J. Duguid: Thrombose als Teilursache bei der Pathogenese der Aortensklerose. J. of Path. 60, 57-61 (1948).

29. J. Duguid: Mural Thrombosis in Arteries. I. internationale Tagung über Thrombose und Embolie, Basel 1954, S. 547
30. M. Eggstein: Zur Analytik des Serumfettes. Medizin und Ernährung 1, 1-6 (1961)
31. M. Eggstein, E. Mammen: Die Beziehung zwischen Blutfetten und Blutgerinnung. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 63, 626-631 (1957)
32. R. Fischer, Parson, G. Morrison: Quantitative Paper chromatography
Nature (London) 161, 764-765 (1948)
33. C.H. Fiske, Y. Subbarow: Bestimmung des Lipoidphosphors in kleinen Blutmengen. J. Biol. Chem. 66, 375, (1925)
34. J. Folch, M. Lees, G.M. Stanley: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226, 497-509 (1957)
35. J. Folch, D. Van Slyke: Nitrogenous contaminants in petroleum ether extraks of plasma lipids.
J. Biol. Chem. 129, 539-546 (1939)
36. E. French, B. Morris, D.S. Robinson: Removal of lipids from the blood stream. Brit. med. Bull. 14, 234-237 (1958)
37. M. Friedmann, S.O. Byers:
Excess lipid leakage: a property of very young vascular endothelium.
Brit.J. exp. Path. 43, 363-372 (1962)
38. W. Fullerton, W.J. Davie: Relationship of alimentary lipaemia to blood coagulability. Brit. med. J. II 250-252 (1953)
39. W. Greig, A. Runde: Studies on the inhibition of fibrinolysis by lipids. Lancet 1956/II 461-463
40. W. Greig: Inhibition of fibrinolysis by alimentary lipaemia. Lancet 1956/II 16-18
41. M.H. Hack: Analysis of lipids by spot tests on filter-paper disk chromatograms. Biochemical J. 54, 602-605 (1953)
42. M.H. Hack: Estimation of the phospholipides in human blood
J. Biol. Chemie 169, 137-143 (1947)

43. H. Halse: Die Fibrinolyse.
Editio Cantor Aulendorf (1948)
44. H. Harders: Über das Sludge-Phänomen in seiner Beziehung zur Coronardurchblutung, Bad Oeynhausener Gespräche II
S. 215-226, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1958
45. C.G. Hirsch: Allgemeine Stoffwechsellmorphologie des Cytoplasmas. Handbuch d. allg. Path.
II,1. Springer Berlin 1955 S. 105
46. H. Jatzkewitz, E. Mehl: Zur Dünnschichtchromatographie der Gehirnlipoide, ihrer Umbau- und Abbauprodukte. Hoppe-Seylers, Zschr.f. phys.Chem. 320, 251-257 (1960)
47. H. Jobst: Die Chylomikronen des Blutes.
Kli.Wo. 33, 746-750 (1955)
48. Jochims: Leucocyten und Fettransport
Kli.Wo. 10, 520-527 (1962)
49. E. Kirk, J. Page, D. Van Slyke: Gasometric microdetermination of lipids in plasma blood cells and tissues
J.Biol.Chem. 106, 203-234 (1934)
50. Prof. E. Klenk: Persönliche Mitteilung
51. M.H. Knisely: Annotated bibliography on sludged blood.
Postgrad. Med. 10, 15 (1951)
52. F. Koller: Die Entstehung der Thrombose
Regensburg, Jahrb. f. ärztl. Fortbildg. 2, 145-148 (1961)
53. B. Kommerell, H.D. Berger: Untersuchungen zur Gerinnungsaktivität und Fibrinolyse bei alimentärer Lipämie. Kli.Wo. 19, 1029-1033 (1959)
54. H.G. Krainick: Bestimmung des Lipoidphosphors in kleinen Blutmengen, Kli.Wo. 17, 706-708 (1938)
55. G. Lasch, W. Kahlke, H. Sessner, K. Schimpf: Zum Wirkungsmechanismus von alimentärem Fett auf die Fakten der Blutgerinnung aus "Gefäßwand und Blutplasma", Symposium an d. med. Klinik Leipzig, Oktober 1959, VEB Gustav-Fischer-Verlag Jena
56. G. Lasch, K. Schimpf: Blutgerinnung und alimentäre Fettbelastung. Dtsch. Archiv. klin. Med. 203, 146-151 (1956)

57. K. Lennert, G. Weitzel: Zur Spezifität der histologischen Fettfärbungsmethoden. Zschr. für wissenschaftl. Mikroskopie und mikrosk. Technik 61, 20-29 (1952)
58. E. Letterer: Lehrbuch der allgemeinen Pathologie Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart 1959, S. 406
59. F. Leuthardt: Lehrbuch der physiologischen Chemie (S.553) 13.Aufl. Berlin, Walter de Gruyter & Co. 1957
60. F. Lindlar: Persönliche Mitteilung
61. MacLacilin, Peterson: Die Ätiologie der Venenthrombose Kll. Wo. 36, 645 (1958)
62. MacLagan, Billimoria: Food lipids and blood coagulation. Lancet 1956/II 235-236
63. G. Marinetti, E. Stotz: Chromatography of phosphatides on silicic acid impregnated paper. Acta biochem. biophys. 21, 168-170 (1956)
64. G. Marinetti: Paper chromatography of phosphatides and other lipids on silicic acid impregnated paper. New York 1961. Persönliche Mitteilung
65. A. Martin, R. Synge: Biochemic. J. 35, 1358 (1941)
66. H. Meessen: Morphologische Beiträge zur Koronarthrombose und zur Pathologie des Myokardstoffwechsels. Regensbg. Jb. ärztl. Fortb. 7, 57 (1959)
67. E. Merck A.G.: Säulenchromatographie-Papierchromatographie Darmstadt
68. J.R. Moreton: Chylomicronemia, fat tolerance and arteriosclerosis J. Laborat. Clin. Med. 35, 373-384 (1950)
69. E. Müller: Leitfähigkeitsmessungen bei Arteriosklerose und Thromboseproblem. Virchow's Archiv 329, 363-372 (1956)
70. F. Mustard: In vitro and in vivo effect of different fat preparations on blood coagulation. Canad. Med. Ass. J. 79, 818-822 (1958)
71. R.O'Brien: Effect of a meal of eggs and different fats on blood coagulability. Lancet 1956/II 232-234

72. R.O'Brien: Some postprandial effects of eating various phospholipids and triglycerides. Lancet 1957/I, 1213-1216
73. E. Perlick: Antikoagulantien. G. Thieme-Verlag, Leipzig II. Auflage 1959
74. F. Perlick: in Max Ratschow: Angiologie, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart 1959, S. 266 ff.
75. F. Pezold: Lipide und Lipoproteide im Blutplasma. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1961
76. Persönliche Mitteilung aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Köln und der Fa. Nattermann.
77. C.F. Poole: Fats and blood coagulation. Brit. med. Bull. 14, 253-257 (1958)
78. C.F. Poole; D. Robinson: A comparison of the effects of certain phosphatides and of chylomicra on plasma coagulation in the presence of Russel's viper venom. Quart. J. of exp. Physiol. 41, 31-35 (1956)
79. C.F. Poole, D. Robinson: The similar effect of chylomicra and ethanolamine-phosphatide on the generation of thrombin during coagulation. Quart. J. of exp. physiol. 41, 36-49 (1956)
80. C.F. Poole, D. Robinson: Further observations on the effects of ethanolamine-phosphatide on plasma coagulation. Quart. J. of exp. physiol. 41, 295-300 (1956)
81. T.A. Prankerdt: The red cell. Blackwell scientific publications Oxford 1961 S. 17
82. J. Rae, E. Eastcott: The effect of urea and sodium chloride on the colorimetric determination of organic phosphate by King's method. J. Biol. Chem. 129, 255-262 (1939)
83. C. Raeburn: The natural history of venous thrombosis. Brit. med. J. 2, 517-520 (1951)

84. R.W. Riemenschneider: Analytical methods and composition of fatty materials. J. Amer. Oil. Chem. Soc. 31, 517 (1954)
85. D.S. Robinson: The chemical composition of chylomikra in the rat. Quart. J. of exp. physiol. 40, 112-126 (1956)
86. C. Rokitsansky: Hdb. d. path. Anat. Vol. 1-3, Verlag Braumüller und Seidel, Vienna 1842, zitiert b.
87. B. Romeis: Mikroskopische Technik
Leibniz-Verlag, München 1948
88. F. Roulet: Methoden der pathologischen Histologie
Wien, Springer Verlag 1948, S. 188
89. G. Schettler: Arteriosklerose, Ätiologie, Pathologie, Klinik und Therapie. Georg-Thieme-Verlag Stuttgart 1961
90. Schöll: Private Mitteilung
91. G. Schettler, M. Eggstein, H. Jobst: Die essentielle Hyperlipämie. Dtsch. med. W.schr. 83, 1-12 (1958)
92. R. Schönheimer, W.M. Sperry: Cholesterinbestimmung aus dem Serum. J. Biol. Chem. 106, 745 (1934) und: J. Biol. Chem. 110, 655 (1938)
93. W. Schrade, M. Bürger: Über die alimentäre Beeinflussung der Blutgerinnungszeit. Kli.Wo. 15, 550-554 (1936)
94. W. Schrade, G. Becker, E. Böhle: Weitere Untersuchungen über die Lipopeptide des Blutes. Kli. Wo. 32, 27 (1954)
95. K. Simon: Die praktische Bedeutung der Phospholipide Med. Monatsschr. 7, 437-442 (1961)
96. Sinapius: Über Chromierungsmethoden zur Lipiddarstellung Histochemie 2, 217-233 (1961)
97. R.L. Swank: Changes in blood produced by a fat meal and by intravenos Heparin. Amer. J. of Physiol. 164, 798-811 (1951)
98. R.L. Swank: Effects of fat on blood viscosity in dogs. Circulation 4, 579-585 (1956)

99. R. Swank, V. Wilmot: Chylomicra: Their composition and their fate after intravenous injection of small amounts of Heparin. Amer. J. of Phys. 164, 798-811 (1951)
100. S. Thannhauser: Die Bedeutung der intrazellulären Speicherung von Cholesterin in der Intima und d. extrazellulären Niederschlagsbildung von Cholesterin in den tieferen Schichten der Gefäßwand für die Pathogenese der Gefäßwandschädigung. Die Medizinische 1952 599-604
101. S. Thannhauser: Lipidoses (diseases of the cellular lipid metabolism) New York: Oxford University Press. 1950
102. Thiele, Wober: Zur papierchromatischen Trennung von Phosphatiden auf einem neuartigen Kieselgelpapier. Hoppe-Seyler's Zschr. f. physiol. Chem. 326 89-93 (1961)
103. Veerkamp, Mulder, van Deenen: Comparative studies on the phosphatides of normal rat liver and primary hepatom. Zeitschr. f. Krebsf. 64, 137-148 (1961)
104. R. Virchow: Thrombose und Embolie. Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medizin. Verlag Grote, Hamm 1862, S. 219
105. V. Vortel: Der morphologische Ablauf der Reaktion nach BCG-Impfung. Virchow's Archiv path. Anat. 336, 46-58 (1962)
106. H. Wagener: Inaugural-Dissertation: Sphingomyelinbestimmung im Blutserum, Marburg 1957
107. A. Werthemann, G. Rutishauser: Zur pathologischen Anatomie der Thrombose. I. Internat. Konf. über Thrombose und Embolie, Basel, 1954
108. M. Westermann, L. Pierce, N. Jensen: Lipid quantification on normal young and normal aged circulating erythrocytes. J. clin. Invest. 38, 1054 (1959)
109. S. Witte, L. Norpoth: Thrombose-Embolie-Herzinfarkt Pathogenese und Therapie Symposium in Essen. Friedrich-Karl-Schattauer Verlag. Stuttgart 1958

110. N. Zöllner, K. Kirsch: Die säulenchromatographische Trennung der Plasmalipide, Methodik und Identifizierung der Faktoren. Ztschr. ges. expm. Med. 134, 10-28 (1960)

Lebenslauf

Am 26. November 1938 wurde ich als Tochter des Landgerichtsdirektors Reinhold Bathe und seiner Frau Rose Bathe, geb. Blättermann in Berlin geboren.

Meine Schulzeit verlebte ich in Berlin und erlangte als Schülerin des mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweiges am 5. März 1957 das Zeugnis der Reife. Meine Studien der Humanmedizin absolvierte ich an der Freien Universität Berlin und im zweisemestrigen Austauschprogramm an der Maximilian-Universität München. Mit Abschluß der ärztlichen Prüfung am 23. März 1964 erhielt ich die Erlaubnis, als Medizinalassistentin zu arbeiten.

Die vorliegende Arbeit wurde im Jahre 1962 unter der Anleitung und Hilfe von Professor Dr. med. Wilhelm MaBhoff und seinem Assistenten Oberarzt Dr. med. Friedrich Lindlar angefertigt. Meinen Lehrern, insbesondere Herrn Dr. Lindlar, schulde ich großen Dank.

